

Dpto. Sanidad Animal  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense

**SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN  
POR EL VIRUS DE MAEDI VISNA EN  
UNA EXPLOTACIÓN DE GANADO  
OVINO**

Tesina de Licenciatura de  
**M<sup>a</sup> Nieves Perdigones Borderías**

Noviembre 2004

Directoras:

Dra. Esperanza Gómez-Lucía

Dra. Ana Doménech Gómez

---

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a Esperanza el haberme brindado la posibilidad de trabajar en su equipo, y en su compañía. Ella me ha sabido transmitir su ilusión por la labor investigadora y, de su mano, he aprendido distintas técnicas laboratoriales con las que he podido realizar esta tesina. Le agradezco su paciencia, su ayuda, su transmisión de conocimientos y sobretodo su eterna sonrisa.

A Ana Doménech por no dejarme en la conformidad, hacerme ver que de cada error se aprende un poco más.

A todo el equipo de “Retrovirus” del departamento de Sanidad Animal (Nuria, Germán, Miguel, Víctor, JuanFran y Ana) por vuestra incondicional ayuda, preocupación, consejo y por estos dos años juntos.

A todos los que amanecieron temprano para ayudarme a tomar muestras y a los que se quedaron hasta más allá del ocaso hasta acabar el trabajo.

A Ángel y Luis y Conrado sin los que nunca hubiéramos podido llevar a cabo este estudio.

A mi familia, que siempre me ha ayudado.

A mis amigos, a todos los que trabajan en el Departamento de Sanidad Animal, a Chiva, por estar siempre ahí.

---

## TABLA DE ABREVIATURAS

APO: Adenomatosis Pulmonar Ovina

CA: proteína de la cápside

CAEV: Virus de la Artritis Encefalitis Caprina

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CMT: test de mamitis de California

CPA: células presentadoras de antígeno

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FIV: virus de la inmunodeficiencia felina

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

IFN: interferón

IL: interleuquina

LB: linfocitos B

LTR: Long Terminal Repeats (Repeticiones Terminales Largas)

MA: proteína matriz

MV: enfermedad de Maedi Visna

MVV: Virus de Maedi Visna

NC: proteína de la nucleocápside

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

rpm: respiraciones por minuto

RT: transcriptasa inversa

SIV: virus de la inmunodeficiencia del simio

SNC: sistema nervioso central

SU: proteína de superficie

TM: proteína transmembrana

---

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
1.1. Historia de la enfermedad	8
1.2. Epidemiología en España	9
1.3. El virus de “maedi-visna”	10
1.3.1. Morfología	10
1.3.2. Organización del genoma vírico	12
Genes esenciales	12
Genes reguladores	14
LTR	15
Comparación entre MVV y CAEV	15
1.3.3. Replicación vírica	16
1.3.4. Patogenia	18
1.4. Enfermedad	20
1.4.1. Transmisión	20
Transmisión horizontal	20
Transmisión vertical	22
1.4.2. Manifestaciones clínicas	23
1.4.3. Cuadro lesional	25
Lesiones en pulmón y ganglios linfáticos regionales	25
Lesiones en mamas y ganglios linfáticos regionales	26
Lesiones en el sistema nervioso	26
Lesiones articulares	27
1.4.4. Evolución de la respuesta inmune	27
Inmunidad humoral y celular	28
Citoquinas	30
1.5 Diagnóstico	32
1.6. Control	35
1.7 Tratamiento	36
<b>2. Objetivos</b>	<b>37</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>39</b>

---

3.1. Animales .....	40
3.2. Toma de muestras .....	40
3.3. Procesamiento de las muestras .....	41
3.3.1. Extracción de ADN.....	43
3.3.2. Amplificación por PCR.....	44
3.3.3. Preparación de control positivo para la PCR.....	45
3.3.4. Secuenciación de secuencias víricas .....	47
3.3.5. Análisis informático de las secuencias obtenidas .....	47
3.3.6. Detección de anticuerpos mediante ELISA .....	47
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>49</b>
4.1. Dificultades encontradas durante la toma de muestras.....	50
4.2. Resultados de PCR y ELISA de las muestras tomadas durante el estudio ...	51
4.2.1. Comparación de métodos serológicos (ELISA) y virológicos (PCR) para la detección de MVV .....	53
Estado de la infección en la población de origen.....	53
Correlación entre métodos serológicos (ELISA) y virológicos (PCR) .....	56
4.2.2. Estudio de la evolución de la infección a lo largo del tiempo .....	62
4.2.3. Seguimiento de la respuesta inmune humoral .....	66
4.2.4. Prevalencia de MVV en la población estudiada .....	68
4.3. Evaluación del efecto de la infección por MVV sobre la producción láctea	69
4.4. Resultados de las secuencias obtenidas .....	73
4.4.1. Secuencias nucleotídicas.....	73
4.4.2. Secuencias aminoacídicas.....	76
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>78</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>81</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

La denominada internacionalmente enfermedad de Maedi-Visna, y en castellano “neumonía progresiva ovina” fue descrita en Sudáfrica y en EE.UU., antes de que su agente etiológico, el virus de Maedi Visna o MVV, fuera descubierto por Sigurdson el año 1957 en Islandia. La enfermedad, que se caracteriza por disnea (en islandés “Maedi”) y pérdida de peso (en islandés “Visna”), era producida por un único virus capaz de ocasionar distintos síndromes, tales como neumonía intersticial, encefalitis, linfadenopatía, artritis, mamitis o caquexia, todos ellos de carácter crónico y progresivo. MVV es un retrovirus, más concretamente un lentivirus ovino, llamado de este modo por el largo periodo de latencia de la enfermedad que produce, es decir, porque no se detecta ningún signo clínico hasta meses e incluso años después del momento de la infección.

La familia *Retroviridae* se conforma de agentes lentivíricos tan importantes como el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), el virus de la artritis y encefalitis caprina (CAEV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV) y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). El parentesco que le relaciona con este último, es una de las principales causas por las que la enfermedad de Maedi Visna, a la que nos referiremos ahora como enfermedad de MV, ha sido tan estudiada en los últimos años, aún cuando existen importantes diferencias entre ambas. Por ejemplo, MVV emplea como células diana los monocitos y macrófagos, mientras que HIV también utiliza a los linfocitos T CD4 + y, al contrario que el lentivirus ovino, produce inmunodeficiencia. De este modo, MVV sirve como modelo para estudiar tanto los efectos de la infección por lentivirus en la biología de los macrófagos como el papel que llevan a cabo los macrófagos en ausencia de inmunodeficiencia.

Es importante reseñar la gran similitud de MVV con CAEV. Ambos virus producen infecciones que persisten de por vida en ovejas y cabras, respectivamente, aún cuando existe una respuesta inmune tanto humoral como celular, y dan lugar a lesiones inflamatorias progresivas en distintos órganos. Experimentalmente ha sido posible inducir la infección cruzada de cabras y ovejas con CAEV y MVV, y las comparaciones entre secuencias recientes de aislados naturales, sugiere que dicha

infección cruzada podría ser incluso llevada a cabo de forma natural. Por ello, no deben mezclarse entre sí ovejas y cabras positivas a lentivirus de pequeños rumiantes (Cheblane *et al.*, 1996; Karr *et al.*, 1996; Rolland *et al.*, 2002).

## **1.1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD**

Sudáfrica fue testigo en 1915, por vez primera, de lo que se describió como un problema respiratorio crónico en ovejas (de la Concha Bermejillo, 1997) y que hoy en día es una enfermedad vírica que ha alcanzado todos los rincones del mundo, a excepción de Australia y Nueva Zelanda. Fue en los años cincuenta, cuando, en Islandia, MVV, “Maedi” (disnea) y “Visna” (pérdida de peso), fue descubierto por Sigurdson.

El origen de la enfermedad en este país nórdico parece hallarse en 1933, cuando fueron importados veinte moruecos de la raza Karakul procedentes de Halle, Alemania, con el objetivo de añadir un valor productivo (lana de gran calidad) al ganado ovino autóctono. El rebaño concluyó satisfactoriamente un periodo de cuarentena en una isla cercana y fue distribuido a lo largo de Islandia sin siquiera sospechar que portaba tres importantes enfermedades: la enfermedad de Maedi Visna (MV), la adenomatosis pulmonar ovina (APO) y la paratuberculosis.

La paratuberculosis, que ya era conocida, se trató mediante vacunación masiva sobre el ganado de reposición (aunque nunca se llegó a erradicar).

La APO fue controlada en los dos años siguientes, y al disminuir su incidencia permitió reconocer aquella tercera enfermedad capaz de afectar no sólo al sistema respiratorio, sino también al nervioso, y que era la causada por el virus de “Maedi - Visna” (Luján *et al.*, 2001).

Cuando se diagnosticó esta última enfermedad, estaba ya tan extendida y las pérdidas directas por mortalidad eran tan grandes (15%-30%) que en 1940 se decidió



ampliar la campaña del APO con la de MV, de tal modo que se procedió al sacrificio total de rebaños en el que aparecían animales afectados, con su subsiguiente sustitución por ganado ovino procedente de zonas no afectadas. En 1974 se llegó a la conclusión de que “Maedi” y “Visna” eran dos síndromes producidos por un mismo virus (Gudnadottir, 1974).

## **1.2. EPIDEMIOLOGÍA EN ESPAÑA**

En España, la enfermedad de MV se encuentra ampliamente distribuida y su prevalencia es media alta.

En nuestro país, el MVV fue descrito y estudiado por primera vez en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, en estudios realizados en el conjunto de las neumonías crónicas de ovinos adultos de la comunidad autónoma del País Vasco. Se vio que un importante número de animales presentaban daños macro y microscópicos compatibles con la enfermedad, y que, además, presentaban anticuerpos frente a MVV. Tras la primera descripción, la enfermedad ha sido detectada en otras muchas comunidades autónomas: Extremadura, Aragón (Ruz *et al.*, 2000), La Rioja, Navarra (Luján *et al.*, 1993), Castilla-León (Maqueda y Olivares, 1993), Castilla La Mancha (de la Cruz *et al.*, 1994), Murcia (Prats y León, 1994; León y Prats, 1996), Madrid (Vega *et al.*, 1995) y Andalucía (Artigas *et al.*, 1999).

La Comunidad Valenciana, Galicia, Cataluña, Cantabria, Asturias o la Comunidad Balear y Canaria, carecen de publicaciones al respecto.

La seroprevalencia de la infección varía entre las distintas zonas geográficas (Tabla 1). En la Comunidad Autónoma del País Vasco, se han estimado unas seroprevalencias globales conocidas de hasta el 100% de los rebaños. En un estudio conjunto que abarcó Aragón, el cono Sur de Navarra y la Rioja, las seroprevalencias oscilaron entre el 95-97,8% con respecto a los rebaños. En Ávila, León, Murcia y la Comunidad Autónoma de Madrid la seroprevalencia en los rebaños es de un 30%, 66%, 21,7% y 43,4% respectivamente (Sotelo *et al.*, 1995; Reviriego, 1998). En la comunidad

de Castilla La Mancha, en una muestra de ovino de raza manchega (producción láctea) la seroprevalencia se cifró en un 12% y se recomendó el control de la infección (de la Cruz *et al.*, 1994).

Sin embargo, cada estudio ha aplicado diferentes métodos y distinto número de muestras tomadas por rebaño, por lo que es complicado comparar todos estos datos.

COMUNIDAD AUTÓNOMA O PROVINCIA	SEROPREVALENCIA DEL REBAÑO %	SEROPREVALENCIA EN ANIMALES
MADRID	43,4	24,5
CASTILLA LA MANCHA	12	-
ÁVILA	30	15
LEÓN	96	66
MURCIA	21,7	-
SEVILLA (SIERRA NORTE	31	-
ARAGÓN CONO SUR DE LA RIOJA Y NAVARRA	95 - 97,8	38,6 - 44,7

Tabla 1: Epidemiología de MVVen España (Lujan *et al.*, 2001).

Maedi Visna y CAEV son enfermedades objeto de comunicación anual (incluidas en la lista B de la Oficina Internacional de Epizootías, pero no en la lista de enfermedades de declaración obligatoria en la Unión Europea y otras de España) (Orden APA/ 1668/2004 del 27 de mayo, BOE 8 de junio de 2004).

### 1. 3. EL VIRUS DE MAEDI-VISNA

#### 1.3.1. MORFOLOGÍA

Taxonómicamente, el virus de Maedi Visna pertenece a la familia *Retroviridae* y más concretamente al género *Lentivirus*.

La partícula vírica, aislada por primera vez en el año 1957 por Sigurdson, es esférica, mide entre 90 y 120 nm de diámetro, consta de una estructura única en tres capas y aloja en su interior dos moléculas iguales de ARN monocatenario, de unos 9-10 Kb, con el extremo 5' metilado y el 3' poliadenilado.

El complejo genoma-nucleoproteína, que se encuentra en la región central del virus y está asociado a la retrotranscriptasa, se rodea de una cápside troncocónica, la cual a su vez se ve recubierta por una envoltura derivada de la célula hospedadora.

Los lentivirus tienen una densidad en gradiente de sacarosa de 1,5-1,6 g/ml y un punto isoeléctrico de 6,8.

Su composición genérica es del 60% de proteínas, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 2% de ARN.

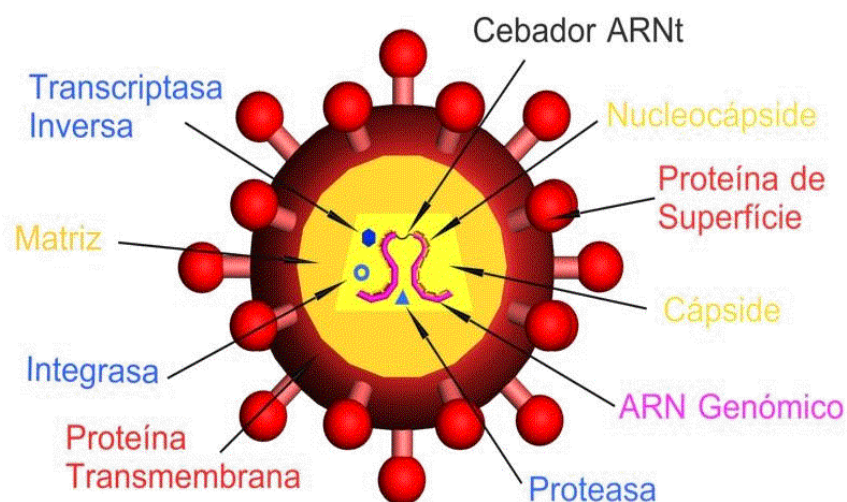


Figura 1: Morfología del virus Maedi Visna.

Es relativamente poco resistente a los agentes químicos, se destruye por el éter, el cloroformo, el periodato, el etanol, el formaldehído, el fenol, la tripsina y la ribonucleasa, pero soporta bien la sonicación. Su falta de ADN le confiere protección frente a la radiación ultravioleta y, evidentemente, frente a la desoxiribonucleasa.

A 56°C se inactiva en 10 minutos, pero a 4°C mantiene su infecciosidad hasta cinco meses; también soporta bien la congelación, e incluso se mantiene infectivo durante varios ciclos de congelación-descongelación.

### **1.3.2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VÍRICO**

El genoma de MVV contiene tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), tres genes reguladores (*vif*, *tat* y *rev*) y largas repeticiones LTR, en los extremos del ADN proviral.

- Genes esenciales

El gen *gag* (Group specific AntiGen) contiene información para tres proteínas, siendo su precursor el Pr55. Dichas proteínas son:

- p25 (CA): proteína de la cápside.
- p14 (NC): proteína de la nucleocápside.
- p17 (MA): proteína matriz que une la cápside y la envoltura.

Es un gen muy conservado en el caso de los lentivirus ovinos. La proteína p25 (CA) produce una gran respuesta inmunológica, y por ello, se ha utilizado como base para desarrollar pruebas diagnósticas.

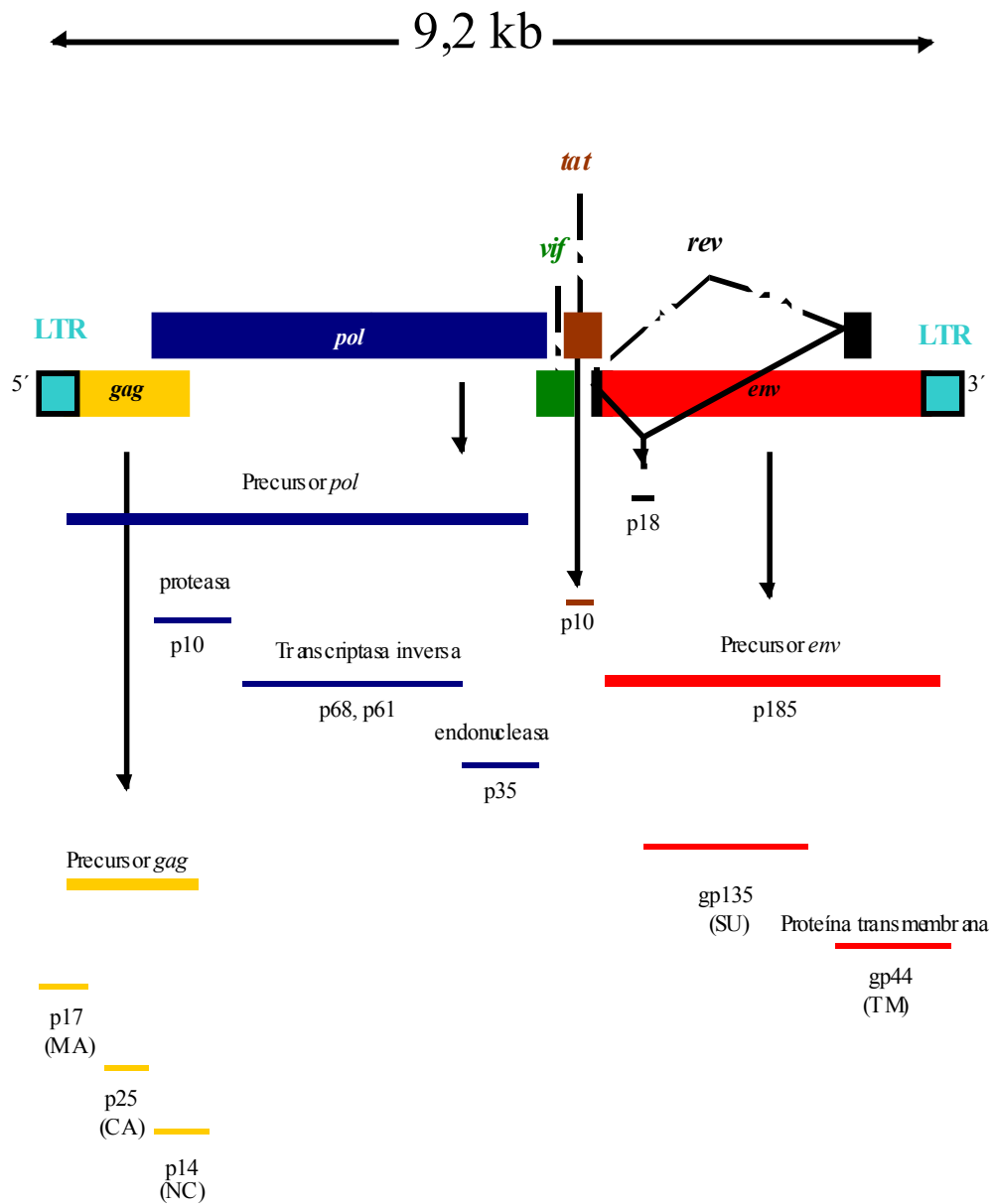


Figura 2. Genoma de Maedi Visna.

El gen *pol* (Polymerase) contiene la información necesaria para la síntesis de:

- Transcriptasa inversa (RT): permite la transcripción del ARN vírico en ADN.
- Proteasa (PR): actúa sobre los precursores proteicos para escindir las proteínas.
- Endonucleasa / integrasa (IN): permite la inserción del ADN vírico en el ADN de la célula hospedadora.
- UTPasa: disminuye la frecuencia de las mutaciones de guanina a adenina.

Todas estas proteínas son muy importantes a la hora de llevarse a cabo la replicación viral y la síntesis proteica .

El gen *env* (Envelope) codifica la glicoproteína gp160. En el interior de la célula hospedadora, ésta se escinde en :

- gp135 (SU): glucoproteína de superficie, con forma de pomo y que sobresale marcadamente de la partícula vírica.
- gp44 (TM): glucoproteína transmembrana, que ancla gp135 (SU) a la envoltura.

La gp135 (SU) es la responsable de la interacción del virus con el receptor de la célula hospedadora y, por lo tanto, de su entrada en dicha célula. El hospedador intenta eludir dicha interacción mediante la síntesis de anticuerpos, que fuerzan mutaciones en las bases que codifican gp135 (SU). La variación antigénica de la proteína de superficie, es la responsable de conferir las propiedades biológicas y serológicas de los distintos aislados, por lo que los test de ELISA basados en la detección de los anticuerpos contra la proteína de superficie son de baja sensibilidad. Todo lo contrario ocurre si detectamos anticuerpos contra la proteína transmembrana, pues ésta se encuentra mucho más conservada.

- Genes reguladores

- El gen *tat* codifica para las llamadas proteínas transactivadoras que incrementan los niveles de expresión del virus.

- El gen *vif* (Viral Infectivity Factor) codifica una proteína reguladora gracias a la cual las partículas víricas adquieren su poder infectante.
- El gen *rev* (REgulator of Virion protein expression) produce una proteína de 19 kDa capaz de atravesar la membrana celular y ejercer su acción reguladora de la expresión vírica en toda su extensión.

- LTR

Durante la replicación del virus en la célula hospedadora, y a lo largo del proceso de transcripción del ARN en ADN, se forman a ambos extremos del ácido nucleico repeticiones largas denominadas LTR (Long Terminal Repeats). Estas LTR son muy importantes para la replicación del virus, pues son lugares de unión para factores de transcripción celular.

- Comparación entre MVV y CAEV

La secuenciación nucleotídica de los genomas de MVV y CAEV demostró que ambos virus presentan una organización genómica similar en lo que se refiere tanto a sus genes estructurales como reguladores. Más aún, algunas secuencias de lentivirus de origen ovino están más relacionadas con CAEV que con MVV y al contrario (Narayan *et al.*, 1993).

Al comparar las secuencias nucleotídicas de MVV y CAEV se comprueba que la homología para los genes *gag* y *pol* entre ambos virus es muy alta, de un 75% y 78% respectivamente. Además los MVV y CAEV parecen ser menos parecidos en lo que respecta a su gen *env* (60%), aún cuando el patrón de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos de las proteínas de la envuelta parecen estar muy conservados (Braun *et al.*, 1987).

De hecho, parecen existir evidencias de que CAEV y MVV saltan la barrera interespecífica entre ovejas y cabras domésticas con relativa frecuencia. Shah *et al.* (2004) han publicado recientemente un artículo en el que se menciona una evidencia directa de transmisión natural de SRLV del subtipo A4 de cabras a ovejas y viceversa.

### 1.3.3. REPLICACIÓN VÍRICA

Cuando la partícula vírica entra en contacto con una célula susceptible, se produce un anclaje de la gp135 (SU) con los receptores celulares, produciéndose la fusión entre la membrana celular y la envoltura vírica. Tras esta fase de adsorción y penetración, la nucleocápside queda liberada en el citoplasma, y es entonces cuando comienza el proceso de retrotranscripción.

La transcriptasa inversa transcribe el ARN vírico en una doble cadena de ADN (prolongando ambos extremos del genoma vírico con las LTR), y éste, ayudado por las nucleoproteínas de la cápside, consigue por fin penetrar en el núcleo celular. Posteriormente la endonucleasa/integrasa inserta la copia de dicho ADN en el ADN de la célula hospedadora, de tal forma que una oveja infectada, lo será de por vida. Cuando el genoma vírico está insertado en el genoma hospedador recibe el nombre de provirus. La zona donde se localiza el punto de integración es aleatoria, y cada célula sólo integra una única copia del genoma vírico puesto que incluso existen fenómenos de interferencia que impiden que una célula ya infectada vuelva a infectarse.

El provirus queda completamente estable dentro del cromosoma celular y dependiente de la maquinaria de transcripción celular en un primer momento, lo que indica una producción vírica bastante baja. Más tarde, las llamadas proteínas transactivadoras, codificadas por el gen *tat*, incrementan los niveles de expresión del virus.

La mayor parte de las proteínas codificadas por *gag* y *pol* se sintetizan en los polirribosomas libres del citoplasma celular a partir de una molécula completa de ARN,



mientras que las proteínas de la envoltura lo hacen en el retículo endoplásmico rugoso de tal modo que quedan unidas a la estructura bicapa de la membrana de éste (Coffin, 1996).

La forma de ensamblaje no se conoce en detalle, aunque parece ser que el precursor *gag* se une:

- por su extremo terminal Carboxi-terminal (futura proteína NC) con el ARN genómico,
- por su región media (futura proteína CA) con otras proteínas víricas,
- por su extremo amino terminal (futura proteína MA) con la membrana celular.

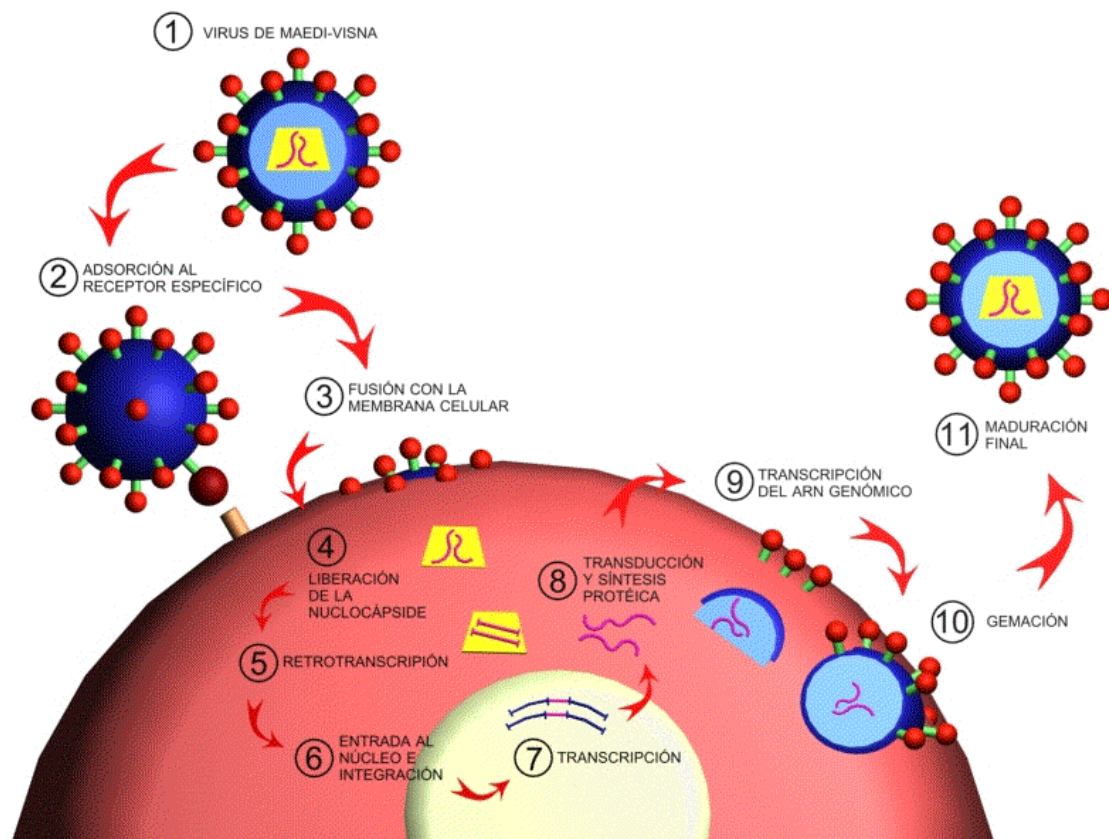


Figura 3 : Replicación de MVV.

Al mismo tiempo, las proteínas de las espículas que ya se encuentran en la estructura de la membrana celular del retículo endoplásmico rugoso se incorporarían al conjunto, y se liberaría por gemación una partícula vírica inmadura. Tras una proteólisis final en la propia partícula vírica, el virión se vuelve infectivo.

#### **1.3.4. PATOGENIA**

Como hemos explicado anteriormente, las células diana principales en la infección natural para MVV son los fagocitos mononucleares (Narayan *et al.*, 1982; Gendelman, 1985). Sin embargo, seguramente son las células dendríticas las encargadas de transportar el virus en sangre y en linfa, aunque la dificultad metodológica para separar monocitos de ésta población celular ha impedido hasta la fecha que ello pudiera ser comprobado (Gorrell *et al.*, 1992).

En MVV la expresión génica aumenta durante el desarrollo de monocito a macrófago, de modo que los monocitos que circulan vía sanguínea contienen el genoma vírico, pero éste no se replica (mecanismo de “caballo de Troya”), de tal modo que los virus son transportados hasta los tejidos sin ser detectados por el sistema inmune. Ello se debe a que la fracción LTR del provirus contiene sitios AP-1 y AP-4 que atan los factores de transcripción celular Jon y Fos, y, a que los núcleos de los monocitos, al contrario que los de los macrófagos, carecen de las proteínas necesarias para la activación de la transcripción.

Ello no quiere decir que sólo sean los monocitos y macrófagos las células donde se replica MVV, aunque sí las más importantes, sino que justamente uno de los métodos más relevantes para la persistencia del virus radica en su diferente tropismo hacia la célula hospedadora y de ciertos aspectos en la interacción lentivirus-célula hospedadora.

Así *in vivo* se han observado proteínas de MVV en fibroblastos y células epiteliales del plexo coroidal, pericitos, linfocitos y células plasmáticas del sistema nervioso central, aunque la infección productiva se restringe a las células de la estirpe

monocito/macrófago (Gorrel *et al.*, 1992; Brodie *et al.*, 1995). Las células epiteliales del epitelio mamario son capaces de emitir partículas víricas completas a la luz alveolar mediante el mecanismo de gemación (Bolea, 1998).

En 1997 Craig *et al.* vieron que MVV se podía replicar *in vitro* en células endoteliales, existiendo una interesante diferencia dependiendo del origen del tejido utilizado para preparar dichas células. También se usan en la replicación *in vitro* células derivadas del plexo coroideo ovino, fibroblastos, células corneales, células epiteliales ovinas, fibroepiteliales de la membrana sinovial caprina, macrófagos y células musculares lisas de la aorta.

Brodie *et al.* (1995) observaron que la replicación vírica en los macrófagos podía ser restringida en ciertos tejidos, e incluso, según Clements y Zink (1996) diferentes cepas de MVV pueden, *in vivo*, diferir en su tropismo hacia la célula hospedadora.

Así se han descrito distintas cepas víricas para lentivirus ovinos según su patogenicidad tanto *in vivo* como *in vitro* (de la Concha Bermejillo, 1997). Las cepas rápidas o altamente patogénicas se caracterizan por inducir rápidamente la formación de sincitios, presentar un título muy alto de replicación, ser muy líticas y producir normalmente signos muy drásticos de enfermedad. Las cepas lentas o de baja patogenicidad inducen lenta pero progresivamente sincitios, presentan bajos títulos de replicación y no suelen producir ninguna evidencia de signo clínico.

Sin embargo, la extensión de la inflamación y el aspecto de los órganos afectados dependen ante todo de la genética del animal infectado, y no tanto de la cepa del virus infectante.

Se ha visto que el grado de neumonía linfoide intersticial, determinado histológicamente en el análisis de secciones pulmonares recogidas mediante necropsia, es independiente de la variedad de virus utilizado en la inoculación, pero está altamente

correlacionado con la cantidad de ADN proviral presente en los macrófagos alveolares. Esto explicaría por qué algunas ovejas que llevan muchos años infectadas no presentan signos clínicos mientras que otras enferman rápidamente.

Algunos estudios epidemiológicos sugieren que la raza “Finesa” posee una mayor tendencia a ser infectada por lentivirus que las razas “Ile de France”, “Rambouillet” o “Columbia” (de la Concha Bermejillo, 1997). En Islandia otros estudios epidemiológicos aseguran la existencia de resistencia asociada a la raza frente a la enfermedad lentivírica inducida. De este modo, de los cruces resultantes entre la raza “Islandesa” y “Border Leicester”, nacen animales particularmente resistentes que tienden a retrasar el desarrollo de las lesiones pulmonares.

## **1 .4. ENFERMEDAD**

### **1.4.1.TRASMISIÓN**

La transmisión de la enfermedad es posible gracias a dos vías, la horizontal y la vertical.

- Transmisión horizontal

La transmisión por vía horizontal puede suceder de forma directa a través de la ruta oro-nasal, por ingestión de calostro y /o leche, o por vía venérea.

La ruta “oro-nasal” es una vía de transmisión por contacto directo. En ella la fuente de infección es el fluido pulmonar expulsado por la tos, pues va acompañado de monocitos y macrófagos alveolares infectados por el virus. Experimentalmente es posible la infección intranasal, intratraqueal e intrapulmonar, siendo la segunda mucho más eficiente que la primera (Torsteinsdóttir *et al.*, 2003). La transmisión por vía oro-

nasal, se encuentra fuertemente asociada al confinamiento en establos, sobretodo en invierno, y aumenta su incidencia tanto con la edad del animal como con la duración de la exposición. Además, las coinfecciones con otros virus o bacterias contribuyen a la diseminación de MVV vía exudados pulmonares.

La “vía calostrál y a través de la leche” son importantes vías de infección para el recién nacido. Como la mamitis es frecuente en los animales infectados, la transmisión se ve favorecida por el reclutamiento de células mononucleares infectadas hacia las glándulas mamarias. De este modo, la cría puede ser infectada con su primera toma de calostro, ya que su intestino presenta una alta permeabilidad a los productos ingeridos en las primeras horas de vida. Aunque Carroza *et al.* (2003) evidenciaron que las células portadoras de virus en las glándulas mamarias eran los macrófagos, también es posible que las células epiteliales en calostro y leche sean fuente de infección, pues, *in vitro*, también permiten la replicación vírica.

En cuanto a la “transmisión venérea”, la presencia de la bacteria *Brucella ovis* puede aumentar la probabilidad de que encontremos virus en el semen. Teóricamente, el virus, al encontrarse en todo fluido corporal, también debería transmitirse mediante esta vía, por lo que es un punto a tener en cuenta en la utilización del semen para la cubrición artificial (Blacklaws *et al.*, 2004).

También es posible la transmisión de la enfermedad de MV por vía horizontal pero de forma indirecta a través de la transferencia de embriones, el medio circundante, los productos animales y las infecciones iatrogénicas.

Si tenemos en cuenta que en “la transferencia de embriones” éstos deben proceder de rebaños seronegativos y que están sujetos a protocolos de lavado según la “Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones”, esta vía de transmisión no parece que pueda crear ningún problema hoy en día. Aún así, no debemos olvidar que se puede hallar ADN proviral en las células del oviducto, lo cual no deja nunca de constituir un riesgo.

Los “productos animales” no constituyen un gran riesgo, pues no es probable que los lentivirus presentes en sangre, tejidos o lana de pequeños rumiantes sobrevivan a los procesos a los que se somete la carne, las menudencias, o la lana, aunque no existen estudios que examinen estos casos.

En cuanto a la “transferencia mecánica durante el ordeño” es una posibilidad que Lerondelle *et al.* confirmaron en 1995, aunque, gracias a los protocolos y la higiene en el ordeño, tampoco se ha reflejado ningún caso.

En cuanto a la “forma iatrogénica” podría transmitirse la infección por la utilización de agujas infectadas.

- Transmisión vertical

La transmisión vertical “in útero” carece de evidencia epidemiológica. Sin embargo, algunas coinfecciones, como la enfermedad de Border, pueden favorecerla. Experimentalmente es posible infectar con lentivirus de pequeños rumiantes embriones de cabra en estadio de 8-16 células, siempre y cuando la zona pelúcida del embrión esté destruida. También se ha evidenciado la infección de fetos con MVV mediante inyección directa en cerebro o en el saco amniótico. La infección de fetos anterior al día 60 produce aborto o reabsorción. Se cree que la infección vía transplacental es posible, aunque se desconoce la tasa a la que puede ocurrir (Blacklaws *et al.*, 2004).

No existe ninguna evidencia de que el genoma de lentivirus de pequeños rumiantes esté presente en la “línea germinal” de ovejas y cabras, en otras palabras, no se han convertido en retrovirus endógenos.

### **1.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La infección por el MVV produce un síndrome multisistémico caracterizado por caquexia, neumonía crónica, inflamación de sistema nervioso central, de la glándula mamaria, articulaciones y ganglios linfáticos regionales.

Todas las manifestaciones clínicas pueden aparecer tanto de forma única como combinada, siendo la asociación más común la de la neumonía junto a la inflamación de la glándula mamaria, aunque suele predominar una sobre otra.

Sin embargo, el porcentaje de animales en un rebaño que llegan a manifestar una cualquiera de estas formas patológicas varía según el tropismo de la cepa vírica, la raza del animal, la carga genética individual, la edad, la ruta inicial de la exposición, la existencia de infecciones secundarias, el manejo y la carga viral en un órgano dado (de la Concha Bermejillo, 1995).

La “forma pulmonar” es la manifestación más típica y siempre aparece en animales de más de 2 años de edad, de forma lenta, progresiva y no evidente. El frío, la escasez de alimentación, el parto o la lactación, son factores que pueden facilitar la aparición de los síntomas.

Los primeros signos clínicos visibles son intolerancia al ejercicio (la oveja infectada se retrasa con respecto al resto del rebaño), disnea y aumento de la frecuencia respiratoria (de 30-40 rpm a 110 rpm), marcada respiración abdominal, extensión del cuello, dilatación de los ollares, respiración con la boca abierta y finalmente disnea incluso durante el reposo.

No existen ruidos significativos a la auscultación pulmonar, aunque los ruidos pulmonares están aumentados en volumen. No hay tos, fluido nasal, o síndrome febril, siempre y cuando no existan complicaciones bacterianas.

El animal presenta apetito aunque adelgaza de una forma crónica tal que le conducirá a la caquexia, y las hembras afectadas parirán corderos pequeños y débiles.

No debemos confundir la enfermedad de MV con la APO, que también puede aparecer en corderos de pocos meses de edad, y se acompaña de murmullos respiratorios a la auscultación pulmonar, tos y fluidos respiratorios. Otros posibles diagnósticos diferenciales lo representan las parasitosis pulmonares o las neumonías bacterianas crónicas (González *et al.*, 1993).

La “forma mamaria” es una de las más frecuentes dependiendo de la raza. Suele aparecer en animales de 3-5 años de edad, aunque también se han visto casos en animales más jóvenes, de hasta un año de edad. Los animales infectados presentan mamitis indurativa crónica de carácter difuso, bilateral y no dolorosa y tumefacción de los nódulos linfáticos retromamarios. Por ello, existe un descenso en la producción láctea que no afecta a las características organolépticas de la leche, pero que, además de acarrear consecuencias económicas, favorecen la hambruna y lento crecimiento de los corderos de hembras afectadas.

El diagnóstico diferencial debe realizarse con la agalaxia contagiosa producida por *Mycoplasma agalactiae* en ganado ovino y caprino. Esta enfermedad produce además queratoconjuntivitis, artritis y alteraciones en las características organolépticas de la leche, cosa que no ocurre con los animales afectados por MV.

La “forma nerviosa” es esporádica en nuestro país, aunque puede existir una confusión entre estas formas atípicas de “Visna” y formas crónicas o atípicas de listeriosis. Suele afectar al ganado ovino mayor de dos años, aunque también se han diagnosticado casos en animales de menor edad en la raza Assaf.



Los síntomas clínicos son incoordinación, ataxia del tercio posterior que progresa hacia el tercio anterior y se continúa con decúbito, postración, paraplejia, cuadraplejia e incapacidad para levantarse del suelo. El animal mantiene su estado de alerta y es capaz de responder a los estímulos externos. A veces pueden apreciarse tics en el labio y en los músculos faciales, e incluso ceguera (Petursson *et al.*, 1990).

El diagnóstico diferencial se realiza con la listeriosis, que es altamente estacional y tiene carácter purulento; con la enfermedad de Aujeszky, asociada al ganado porcino; con el scrapie, en donde aparece prurito agudo; con la cenurosis, enfermedad cuyas zonas de inflamación coinciden con los trayectos parasitarios y con la enfermedad de louping-ill, transmitida por el vector *Ixodes ricinus*.

La “forma articular” suele aparecer dos o tres años después de la infección, cuando se evidencia inflamación en las articulaciones carpales y tarsales, cojera, marcha envarada y caquexia a pesar de no existir pérdida de apetito.

Debemos realizar un diagnóstico etiológico bacteriano o diferencial mediante histopatología antes de pensar en MVV como causa de la artritis.

### **1.4.3. CUADRO LESIONAL**

- Lesiones en pulmón y ganglios linfáticos regionales

- Macroscópicas

Los pulmones presentan forma acampanada, con bordes redondeados, aspecto tumefacto y coloración más clara de lo normal (amarillento-grisáceo), a veces acompañada de un punteado grisáceo subpleural.

Los nódulos linfáticos pulmonares están tumefactos, no se observa una clara delimitación entre la zona medular y la cortical. Los nódulos mediastínicos caudales están hipertrofiados.

- Microscópicas

Los pulmones afectados presentan neumonía intersticial crónica con infiltración de linfocitos, macrófagos, monocitos y células plasmáticas en el intersticio de los septos interalveolares, que impiden el intercambio normal de gases entre los capilares y los alvéolos pulmonares. Cuando la enfermedad está muy avanzada aparece una fibrosis pulmonar parcial.

En los nódulos linfáticos regionales del pulmón existe una linfadenitis reactiva crónica no específica, con hiperplasia de los folículos linfoides corticales e histiocitosis de los senos medulares. También aparece una hiperplasia linfoide difusa, que es la responsable del punteado grisáceo subpleural anteriormente mencionado (Cotran *et al.*, 1999).

• Lesiones en mamas y ganglios linfáticos regionales

- Macroscópicas

Las mamas aparecen firmes y tersas, a veces muy endurecidas. A la sección presentan un aspecto no glandular con superficie lisa, húmeda y uniforme.

- Microscópicas

Es característica su presentación difusa, al contrario que las mamitis bacterianas, se habla de una mamitis intersticial crónica con inflamación linfocitaria, que además se acompaña de hiperplasia de los ganglios mamarios.

Lesiones en el sistema nervioso

- Macroscópicas

---

Se pueden encontrar áreas grisáceas de malacia en la sustancia blanca periventricular, que pueden llegar a producir necrosis por licuefacción.

- Microscópicas

Produce una encefalomielitis no purulenta desmielinizante crónica. Al principio aparecen pequeños infiltrados inflamatorios de linfocitos, monocitos y algún macrófago subependimarios, así como gliosis y formación de manguitos celulares perivasculares.

#### Lesiones articulares

- Macroscópicas

La membrana sinovial aparece enrojecida y engrosada, el cartílago articular está erosionado y hay un aumento de la cantidad de líquido sinovial en la articulación (más de 30 ml).

- Microscópicas

La inflamación de la articulación se caracteriza por la proliferación de la membrana sinovial y una severa infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos subsinoviales. Pueden aparecer fibrina y depósitos de inmunoglobulina en la membrana sinovial. Puede evolucionar hacia una degeneración del cartílago articular, mineralización de la cápsula articular y su reemplazo por crecimiento periostial (Narayan *et al.*, 1995).

#### **1.4.4. EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE**

Maedi-Visna tiene un largo periodo de incubación, la infección persiste toda la vida y los animales actúan como reservorios. Además, los lentivirus de pequeños rumiantes no producen inmunodepresión en el hospedador, al contrario que FIV, SIV y HIV (Clements y Zink, 1996).

Aunque existe un largo periodo de latencia de meses e incluso años desde que se produce la infección, hasta que empieza a desarrollarse la enfermedad, los individuos infectados comienzan a sufrir una fase aguda de replicación vírica durante las primeras semanas postinfección. Esta fase aguda se sigue de una potente respuesta inmune que la restringe hasta niveles muy bajos, aunque no llega a producir la eliminación completa de los virus, los cuales quedan en el interior de las células diana, escapando de la respuesta celular y humoral. Esto pudo comprobarse en un estudio con ovejas infectadas experimentalmente con lentivirus ovinos, pues se observó un pico de células asociadas a virus entre las dos y ocho semanas postinfección, que fue disminuyendo gradualmente hasta llegar a la semana 16. La seroconversión ocurrió entre las dos y ocho semanas siguientes a la inoculación, por lo que la coincidencia entre la aparición de la seroconversión y la disminución de células asociadas a virus, hizo suponer que la infección por el virus se encontraba bajo control inmune (Blacklaws *et al.*, 1995).

- Inmunidad humoral y celular

La infección por MVV produce dos tipos de respuesta por parte del organismo infectado: una respuesta humoral y otra de tipo celular.

En cuanto a la respuesta humoral, la infección de MVV induce la síntesis de anticuerpos específicos fijadores del complemento y neutralizantes.

En infecciones experimentales se ha visto que se sintetizan anticuerpos frente a p25 (CA), apenas a las 3 semanas postinfección, y frente a gp44 (TM), dos semanas después (Juste *et al.*, 1995). Sin embargo, como la mayoría de los anticuerpos neutralizantes que se dirigen hacia la glucoproteína de superficie, aparecen de forma tardía y son de baja afinidad, se cree que no juegan el papel protector principal frente a la infección (Kennedy-Stoskopf y Narayan, 1986).

Todavía no han sido determinados los mecanismos por los que la neutralización de MVV resulta ineficiente (Bertoni *et al.*, 1994; Pancino *et al.*, 1994). Por ello se

estudian como posibles responsables el tropismo hacia la célula hospedadora, las regiones inmunodominantes en Env, que pueden actuar como señuelo disminuyendo una posible respuesta protectora por parte de los anticuerpos (Garrity *et al.*, 1997), y la interacción lentivirus-célula hospedadora.

La respuesta celular, sin embargo, es básica para eliminar las infecciones víricas, activar a los macrófagos y regular las respuestas humorales.

Recordaremos que la respuesta celular se produce cuando los linfocitos T reconocen antígenos presentes únicamente en otro tipo de células. Este reconocimiento es posible gracias al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), un conjunto de genes capaz de codificar moléculas de clase I y II que reaccionan con antígenos intra y extracelulares respectivamente.

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II se encuentran en las células presentadoras de antígeno (CPA) tales como las células dendríticas, fagocitos mononucleares o linfocitos B (LB). Como respuesta al reconocimiento de los complejos antígeno-CMH, los LT CD4<sup>+</sup> generan estímulos para la proliferación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos (LT CD8<sup>+</sup>) y LB.

Por otro lado, todas las células nucleadas expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I al reconocer antígenos en su citosol y, por lo tanto, todas las células nucleadas son capaces de presentar péptidos a los linfocitos T citotóxicos (LT CD8<sup>+</sup>). Los LT CD8<sup>+</sup> diferenciados reconocen a los péptidos asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I, y ejercen su función destructiva frente a células infectadas.

En cabras se ha comprobado que los mecanismos de resistencia genética hacia la enfermedad clínica están relacionados con los antígenos CMH I y II (Ruff *et al.*, 1993) aunque éstos no han sido determinados para ovejas.

A nivel de los órganos diana aumenta significativamente el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y se invierte el cociente CD4/CD8. El aumento de LT CD8<sup>+</sup> se explica por una mayor presentación de antígeno y por el aumento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, sobre todo de la clase II. La mayor expresión de CMH I y CMH II favorece la presentación de MVV *in vivo* a las células T y, por lo tanto, la linfoproliferación característica de las lesiones de MV.

En pulmones afectados existe un aumento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y un descenso de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el alveolo pulmonar. Dicho aumento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, resulta el único indicativo *in vivo* hasta ahora conocido para cuantificar la intensidad de la lesión, pues es el responsable de la actividad citotóxica frente a células portadoras de antígenos virales, es decir, frente a los macrófagos pulmonares (Luján *et al.*, 1995).

En el síndrome mastítico, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se concentran en grandes grupos mientras los linfocitos T CD8<sup>+</sup> están alrededor de la barrera epitelial, donde se replica el virus masivamente. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> actúan sobre los acinis, los dañan y por ello se impide la producción láctea.

En el encéfalo, la mayoría de los linfocitos T son CD8<sup>+</sup> y hay un aumento de CMH de clase II. En el sistema nervioso central (SNC) y en el líquido cefalorraquídeo, el cociente CD4/CD8 está invertido (Torsteinsdóttir *et al.*, 1992).

En la membrana sinovial y líquido articular predominan los linfocitos CD4<sup>+</sup> y la expresión de las moléculas de clase II del CMH.

- Citoquinas

La infección por lentivirus en pequeños rumiantes produce una alteración en la producción de interleuquinas (Zink y Johnson, 1994). Existen muchos tipos de

interleuquinas, pero todas estimulan el crecimiento y la diferenciación de linfocitos y activan a las células efectoras durante la inmunidad adaptativa.

Las interleuquinas de tipo 2 (IL-2) actúan de forma autocrina, pues son sintetizadas por los LT CD4<sup>+</sup> estimulados por antígeno y actúan sobre sí mismos como factor de crecimiento. Los niveles de IL-2 disminuyen en animales sintomáticos, lo que sugiere un descenso de la defensa inmune frente a MVV en dichos animales (Carey y Dalziel, 1993; Begara *et al.*, 1995).

Los macrófagos alveolares en cuyo interior se replica MVV a altas velocidades incrementan la expresión del ARNm de IL-8, de tal forma que a mayor cantidad de IL-8 producida, mayor es la lesión en pulmones (Legastelois *et al.*, 1996).

También existe un aumento de los niveles del factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF), del receptor para la IL-2 (IL-2R) y para las interleuquinas: IL-1 $\beta$ , IL-4, e IL-10 (Woodwall *et al.*, 1997), aunque, sorprendentemente, la expresión de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no aumenta, por lo que podemos sugerir que, en la infección por MVV, no todas las citoquinas se encuentran alteradas.

Además, los linfocitos T, al interactuar con macrófagos infectados, producen un interferón que parece ser específico de lentivirus (LV/IFN) (Kennedy *et al.*, 1985; Narayan y Cork, 1985). Dicho interferón retrasa la maduración de los monocitos infectados a macrófagos, pero, al mismo tiempo, es quimiotáctico para los linfocitos y aumenta la expresión de moléculas de clase II en macrófagos, que sintetizan proteínas Jon y Fos, capaces de aumentar la transcripción de ARN vírico. El aumento de este interferón y de los linfocitos que lo producen, puede estar, por tanto, relacionado con las lesiones a las que da lugar el MVV, caracterizadas por la presencia de linfocitos en las células diana (Narayan *et al.*, 1993).

Es decir, MVV produce realmente una alteración de la respuesta inmune tal que se mantiene la presentación de antígeno por parte de los macrófagos hacia los linfocitos

T, los cuales penetran en el órgano afectado en forma de células citotóxicas y producen el cuadro lesional típico.

## **1. 5. DIAGNÓSTICO**

La infección por MVV se puede diagnosticar por el análisis de los signos clínicos, el estudio anatomopatológico e histopatológico, el análisis inmunológico, el aislamiento del virus y la realización de la técnica de PCR.

Si bien los signos clínicos que produce MVV no son patognomónicos de la enfermedad, su aparición, evolución y mantenimiento en el ganado, puede llevarnos a sospechar de ella. No debemos olvidar que son de gran importancia informativa a la hora de realizar la necropsia en el animal y tomar muestras para el examen histopatológico.

La respuesta humoral que genera la infección por MVV, incluso 2-3 semanas post-infección, y que se mantiene a lo largo de la vida del animal, resulta muy útil para poder llegar a un diagnóstico definitivo. Así se han desarrollado distintas pruebas serológicas como la seroneutralización, la fijación del complemento, la hemoaglutinación pasiva, la inmunofluorescencia indirecta, el Western blotting, la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y ELISA.

El AGID fue aplicado por primera vez por Terpstra y de Boer en 1973 y mejorado por Cutlip, Winward *et al.* en 1977 y 1979 respectivamente. Hoy representa el test de referencia en Europa por su alta especificidad, sin embargo posee una sensibilidad menor que otros métodos diagnósticos como ELISA, Western blotting o PCR, por lo que se piensa que no tardará en ser sustituido por alguno de ellos. La técnica de AGID se basa en la utilización de un antígeno soluble no fraccionado, que es un concentrado proveniente del cultivo de células infectadas con la cepa WLC 1 MVV que contiene la proteína p25 (CA) y gp135 (SU). El antígeno da lugar a dos bandas de precipitado que se corresponden con cada una de las proteínas anteriormente citadas, de



tal modo que el animal infectado puede presentar una o dos bandas. Por lo tanto, el AGID identifica los anticuerpos anti-p25 (CA) y anti-p135 (SU).

Los actuales test de ELISA permiten una detección precoz de la infección y la valoración semicuantitativa de la tasa de anticuerpos (Howers *et al.*, 1982; Vitu *et al.*, 1982; Ruso *et al.*, 1988), aunque para alcanzar estos logros han sufrido varias fases desde su descripción. Se distinguen pues varias generaciones, en relación a las características de los conjugados y antígenos utilizados.

La primera generación utilizaba como antígeno el virus completo procedente de sobrenadantes de cultivos virales altamente purificados, y como conjugado sueros policlonales. El principal problema era la aparición de falsos positivos al coexistir proteínas celulares copurificadas con las virales. Este problema podía resolverse diluyendo la muestra, pero al mismo tiempo disminuía la sensibilidad del test y aparecían falsos negativos.

La segunda generación de test de ELISA utilizaba antígenos de gran pureza obtenidos por recombinación del ADN en cultivos bacterianos de *Escherichia coli*, y el conjugado se componía de anticuerpos monoclonales. Entre las proteínas recombinantes que se utilizaban como antígeno destacaban las proteínas p25 (CA), y gp46 (TM).

La tercera generación utiliza oligopéptidos sintéticos de gran pureza estructural, mejorando la especificidad pero disminuyendo la sensibilidad, por lo que se le asocian proteínas recombinantes de la nucleocápside vírica.

La mayoría de estudios indican que la sensibilidad de los test de ELISA actuales supera a los test de AGID (Howers *et al.*, 1989; Zanoni *et al.*, 1991; Kwang *et al.*, 1993).

La técnica de Western blotting se ha utilizado para analizar las respuestas de los anticuerpos hacia las proteínas virales gp135 (SU), gp 44 (TM), p25 (CA), p17 (MA) y p14 (NC) en suero de ovejas y cabras infectadas experimentalmente o de forma natural, observándose que se pueden originar resultados falsos positivos. La técnica de Western blotting es, según algunos autores, tan sensible o más que los test de ELISA (Brodie *et al.*, 1992; Howers *et al.*, 1989; Zanoni *et al.*, 1989) pero como no resulta conveniente su uso en grandes colectividades, resulta más útil como test confirmatorio.

En cuanto al diagnóstico etiológico, destacan el aislamiento del virus a partir de explantes primarios. Para ello se ponen en cultivo células del animal del que se quiere obtener un aislamiento y si éste se encuentra infectado debería verse un efecto citopático con formación de sincitios y placas de lisis tras dos semanas de incubación. Sin embargo, y aunque el cultivo de MVV no requiere medios especiales, no es una técnica que suela utilizarse de forma habitual, pues el virus libre resulta poco infectivo y no todas las líneas celulares pueden mantener la replicación del virus.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el caso de MVV, requiere una primera transformación de cadenas de ARN vírico a ADN, mediante el uso de la transcriptasa inversa, y por ello se le denomina RT-PCR. Sin embargo la eficacia práctica de la técnica de RT-PCR es muy baja, ya que la cantidad de partículas víricas en tejidos y fluidos de animales infectados por MVV son muy pequeñas. Por ello, se aprovecha la capacidad de los lentivirus de penetrar en el ADN celular, y se desarrollan técnicas de PCR, que amplifican diversas zonas del genoma según la especificidad y la conservación entre aislados de la secuencia diana de los cebadores o primers. Así se ha detectado la infección de MVV mediante amplificación de zonas conservadas en LTR o en los genes *gag* y *pol* principalmente (Zanoni *et al.*, 1990 a.b). El diagnóstico por PCR puede mejorar al aplicarse previo cocultivo (Brodie *et al.*, 1992), Southern blotting, hibridación (Redy *et al.*, 1993) o utilizando iniciadores degenerados y protocolos de anidamiento y semianidamiento (Leroux *et al.*, 1997; Waghter *et al.*, 1998; Travassos *et al.*, 1999; Celer *et al.*, 2000).

El diagnóstico por PCR de MVV puede llevarse a cabo sobre muestras de sangre, leche, semen e incluso a partir de tejidos recogidos post-mortem. El diagnóstico

de MVV mediante extracción de ADN o ARN en leche ha dado lugar a resultados muy diversos ya que no sólo pueden existir sustancias inhibitorias, sino que además se ha sugerido que puede suceder una emisión intermitente de células infectadas por el virus en la leche que limitaría la aplicación de la PCR en condiciones de granja (Vitu *et al.*, 1997).

En resumen se puede decir que no existe todavía ningún método de diagnóstico para MVV con una sensibilidad y especificidad lo suficientemente alta que permita utilizarlo como única técnica de diagnóstico fiable. Por esta razón todos los estudios utilizan una combinación de dos métodos, y en los últimos años se tiende a utilizar la técnica de PCR como instrumento de identificación precoz junto a cualquier método serológico.

## **1.6. CONTROL**

La falta de vacunas y la inviabilidad económica del tratamiento de la infección por MVV pone de relevancia el papel que ejerce el control de esta enfermedad sobre la cabaña ovina. Éste se basa en la cuarentena, manejo o sacrificio.

En Islandia, al no existir métodos de diagnóstico fiables en los años 40, se llevó a cabo el sacrificio completo de todo rebaño en que hubiera algún animal enfermo, vacío sanitario y posterior reposición con animales provenientes de áreas no afectadas.

Tras la aparición de métodos de diagnóstico fiables, los métodos de control se basaron en detectar a todos los adultos seropositivos, sacrificarlos (es conveniente sacrificar también a su progenie) y sustituirlos por otros seronegativos acreditados. Todo ello sólo puede llevarse a cabo si la cantidad de animales afectados es pequeña y existen recursos económicos suficientes, por lo que se cree más conveniente separar a los animales infectados de los seronegativos y realizar test de diagnosis cada seis meses para incluir a los nuevos infectados en su rebaño correspondiente. El principal

problema en este caso sería poder contar con la mano de obra suficiente para trabajar con dos rebaños.

Existen otros sistemas para intentar controlar la prevalencia de la enfermedad de MV en los rebaños:

- a) Retirar al cordero tras el parto, evitando cualquier contacto madre-hijo y alimentar de forma artificial a la cría (sólo es rentable si el nivel producción de los parentales lo justifica).
- b) Analizar todo el rebaño, marcar a las seropositivas, efectuar la recría con la progenie de individuos seronegativos y sacrificar a los animales sintomáticos.

## 1.7. TRATAMIENTO

La búsqueda infatigable de tratamientos contra el HIV ha favorecido la investigación sobre agentes inhibidores de la replicación de los lentivirus. Así se sabe que los análogos derivados de los 2'/3' dideoxinucleótidos, ribavirín, fosfonoformato e interferón alfa inhiben la replicación de MVV *in vitro*.

El interferón tau reduce, *in vitro*, un 95% de la replicación viral en células de la membrana sinovial de cabra, comparada con controles tratados con placebo, mientras que, *in vivo*, la eficacia de este producto varía según el momento de la infección en el que se aplique. Parece ser que su acción principal es reducir el pico de viremia inicial y, por lo tanto, la difusión posterior del virus a los tejidos. Además, no sólo es un agente antivírico sino que también aumenta el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, es decir, también ejerce una función inmunomoduladora. El principal problema de este eficaz tratamiento es su aplicación, pues se debe tratar al animal todos los días. Por ello se estudia la posibilidad de crear clones moleculares de MVV con capacidad de replicación y que expresen el gen del interferón tau, lo cual se conseguirá probablemente creando una delección en la región que codifica para la dUTPasa (Zhang *et al.*, 2000).

## **2. OBJETIVOS**

El trabajo que presentamos, titulado “Seguimiento de la infección por el virus de Maedi-Visna en una granja de ganado ovino” es un estudio epidemiológico basado en la toma de muestras de sangre y leche de 50 ovejas a lo largo de un año. Los objetivos que hemos perseguido son los siguientes:

1. Comparar los métodos serológicos (ELISA) y virológicos (PCR) para la detección de MVV.
2. Estudiar la evolución de la infección a lo largo del tiempo.
3. Realizar un seguimiento de la respuesta inmune humoral.
4. Evaluar el efecto de la infección de MVV sobre la producción láctea.
5. Realizar un seguimiento de la evolución del virus y observar las posibles diferencias entre aislados de leche y aislados de sangre.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1. ANIMALES

Se estudió un total de 50 ovejas, pertenecientes a una explotación localizada en Guadalajara, con un tamaño de 1500 cabezas, en régimen semiextensivo. Las ovejas habían sido sometidas a tratamiento para sincronización de celo, introduciendo una esponja vaginal de progestágenos (acetato de fluorogestona o medroxiprogesterona) durante 12 días, entrando en celo 36 horas después de su retirada. En la explotación, se producen 1,26 partos por oveja al año y el periodo de lactación aunque es variable en cada animal es de unos 120 días en general. El destete se produce a los 35-45 días tras el parto. El ordeño es mecánico, con 80-100 pulsaciones por minuto y un nivel de vacío de 300-350 mmHg, en una sala de ordeño de tipo Casse.

De las 50 ovejas estudiadas, 42 eran de raza manchega, y 8 eran cruce F1 de Assaf con Manchega (para incrementar la producción láctea de esta última). El resto de características productivas de cada animal en estudio (edad, número de partos, litros de leche producida a lo largo de su vida y por día) vienen reflejados en las Tablas 25 y 26.

### 3.2. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras se realizó en cinco ocasiones, desde el mes de Noviembre de 2002 hasta Octubre de 2003, con un espacio de dos meses y medio entre cada una. En el momento de la toma se llevaba a cabo un examen visual del estado de la oveja, especialmente de las ubres, que eran palpadas para detectar cualquier tipo de induración. Se tomaron muestras de sangre y de cada ubre por separado de cada una de las ovejas incluidas en el estudio.

Nº DE TOMA	FECHA (DÍA/MES/AÑO)
1	27/11/02
2	06/02/03
3	22/04/03
4	22/07/03
5	06/10/03

Tabla 2 : Datación de las tomas de muestras.



La sangre se obtenía por punción en la yugular con jeringas de 5ml y agujas de 21G, y se transfería de forma inmediata al interior de tubos recubiertos de heparina, que se invertían repetidamente para evitar la coagulación de la muestra.

La leche procedente de cada ubre se obtenía por ordeño manual directamente hacia tubos de 20 ml. Previo a la toma de leche, se vertía un chorro de leche de cada ubre a una paleta para el test de mamitis de California (CMT), la cual se mezclaba en una proporción 1:1 con el reactivo. El resultado obtenido se anotaba siguiendo el siguiente criterio:

- : ausencia de mamitis
- + : mamitis poco evidente
- ++ : mamitis evidente
- +++ : mamitis muy evidente

Los tubos eran identificados con un número provisional, que posteriormente se correlacionaba con el número de los crotales.

### **3.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras se trasladaban inmediatamente al laboratorio, en donde se identificaban correctamente, alicuotaban y procesaban. El diagnóstico se realizaba mediante una prueba serológica (ELISA) y una prueba virológica (PCR). Los tubos de 5ml conteniendo las muestras de sangre se centrifugaban (centrífuga Sorvall RT 6000D) durante 5 minutos a 1500 rpm, y, tras retirar el plasma y trasladarlo a un tubo Eppendorff para conservarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se procedía a extraer el ADN, a partir de la fracción celular sanguínea (Figura 4).

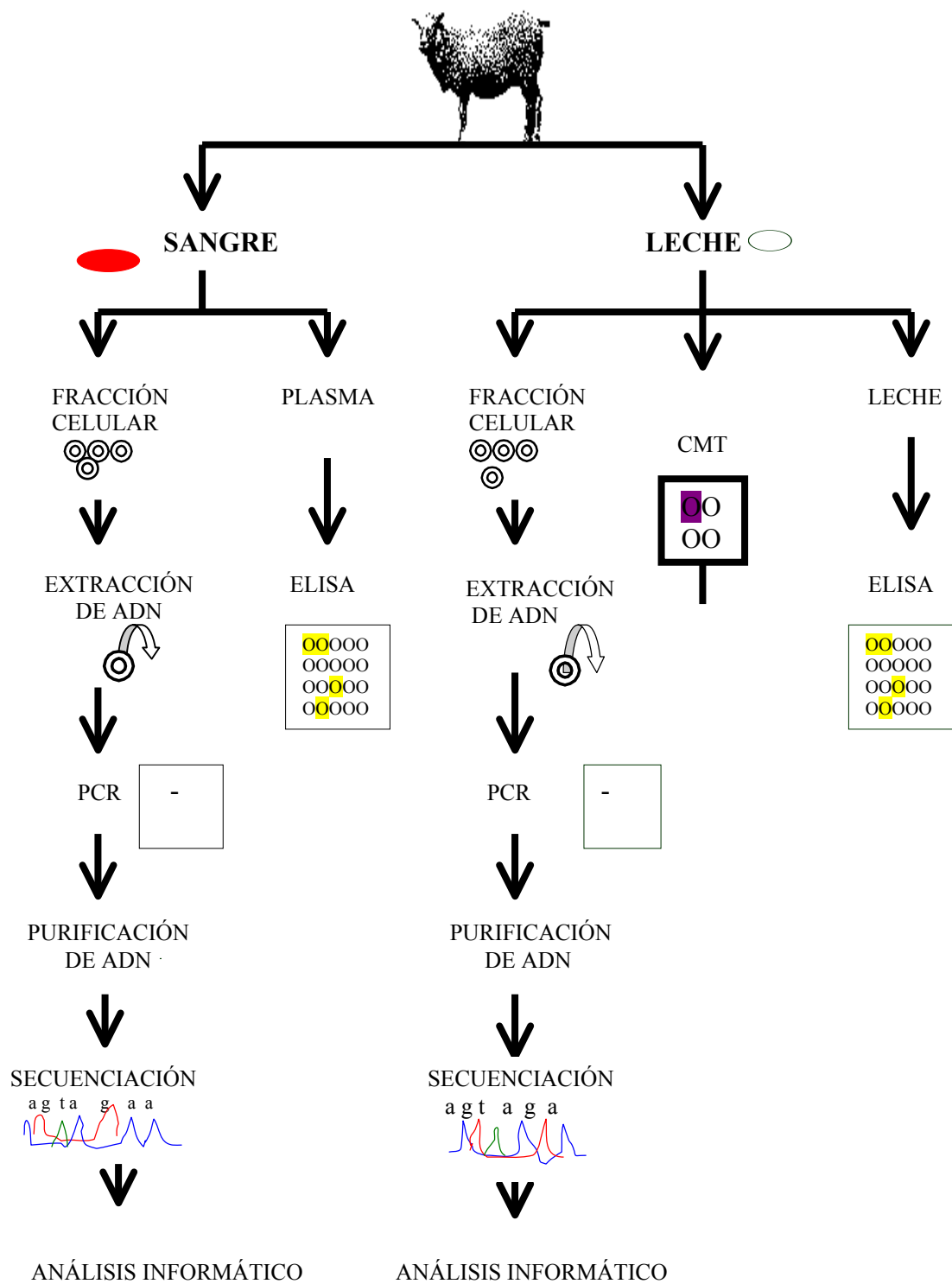


Figura 4: Esquema de la metodología experimental empleada en el estudio; CMT: test de mastitis de California.

### 3.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Para extraer el ADN de las muestras de sangre se seguía un protocolo clásico con cloroformo/alcohol isoamílico. Se comenzaba lisando los eritrocitos, llenando el tubo de 5ml, que contenía la fracción celular sanguínea, con un tampón de lisis ( $\text{KHCO}_3$  10mM;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  460 mM; EDTA 0,1 mM) hasta que la muestra adquiría un color rojo burdeos. Tras cenfrifugar a 1800 rpm (centrífuga Sorvall RT 6000 D), se resuspendían las células en 1 ml de PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,01M;  $\text{ClNa}$  0,8%), que se transfería a un tubo Eppendorf, para lavar tres veces con PBS, centrifugando durante 5 minutos a 6000 rpm (centrífuga Hermle Labortechnik z 160m). Se añadía 500  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción de ADN (Tris  $\text{ClH}$  200mM, pH 7,5; EDTA 25 mM;  $\text{ClNa}$  250 mM; SDS 0,5%) y se incubaba la muestra en hielo durante al menos 15 minutos. Posteriormente se centrifugaba durante 8 minutos a 4000 rpm y se trasladaba el sobrenadante a otro tubo, al que se extraía el ADN con 250  $\mu\text{l}$  de fenol y 250 $\mu\text{l}$  de cloroformo: alcohol isoamílico (CIA). Se centrifugaba durante 3 minutos a 14000 rpm, se transfería el sobrenadante a otro Eppendorff, para completar la extracción con otros 500  $\mu\text{l}$  de CIA. Se volvía a centrifugar durante 3 minutos a 14000 rpm y se precipitaba el ADN del sobrenadante con 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío. Tras recoger el ADN precipitado, centrifugando durante 2 minutos a 14000 rpm, se lavaba el sedimento con 1ml de etanol. Tras centrifugar nuevamente, el sedimento se dejaba secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se añadían 40  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ), y tras rehidratar el sedimento durante 30 minutos, se almacenaba a  $-20^\circ\text{C}$ .

Para la extracción de ADN de las muestras de leche se partía de un tubo Eppendorf que contenía 1 ml de muestra. Se almacenaba a  $4^\circ\text{C}$  durante unas 2-3 horas, para facilitar la eliminación de la fracción grasa de la misma. Se centrifugaban los tubos Eppendorf a 6000 rpm durante 5 minutos, y posteriormente, con un palillo para cada muestra, se retiraba la capa grasa superior. Se centrifugaba de nuevo y se eliminaba el sobrenadante, procediendo a lavar la fracción celular del sedimento con PBS. Tras añadir 500  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción de ADN se procedía del mismo modo que se ha descrito para la sangre.

### 3.3.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR

Se utilizaron los iniciadores propuestos por Leroux *et al.* (1997), que amplifican una región en el gen *pol*. Se trata de una PCR semi anidada en la que amplifica primeramente un fragmento de 475 pb al utilizar los iniciadores degenerados P1 y P2, y se utiliza el producto resultante para una segunda amplificación, de 303 pb, en la que el iniciador P1 es sustituido por P3 (Tabla 3, Figura 5).

PRIMER	SECUENCIA			
P1	5'-DSAAGARAAATTARARGG-3'			
P2	5'ATCATCCATRTATATBCCAAATTG-3'			
P3	5'-GATTTAACAGAGGCACA-3'			
B=C ó T	D = A, G ó T	R = A ó G	S = C ó G	

Tabla 3: Iniciadores o primers empleados para la PCR (Leroux *et al.*, 1996).

La amplificación se llevó a cabo durante 35 ciclos de: un minuto a 95°C para que las hebras de ADN se separen, un minuto a 45°C para anillamiento, y un minuto a 72°C para la extensión, empleando un termociclador modelo PTC-100 de MJ Research, Inc. En nuestro caso, hemos realizado la PCR semi anidada utilizando el mismo programa para la primera y segunda PCR, modificando pues el protocolo descrito por Leroux *et al.* (1996).

Tanto en la primera como en la segunda amplificación, los reactivos incluidos en cada reacción fueron los siguientes:

- 15,5 µl de ddH<sub>2</sub>O
- 2,5 µl de buffer 10x.
- 0,5 µl dNTP (2mM) (Biotools)
- 1,25 µl P1 (100 µM)
- 1,25 µl P2 (100 µM)
- 1,0 µl Taq (1U/µl) (Biotools)

Para la primera reacción se utilizaban 3 µl de ADN extraído. Para llevar a cabo la segunda PCR se utilizó 1 µl del producto de la primera PCR. Los productos amplificados se pusieron de manifiesto en un gel de agarosa al 1,5% en TAE, tras mezclar 12 µl de la muestra amplificada con 3 µl de tampón de carga (0,25% azul de bromofenol y 40% de sacarosa en agua destilada).

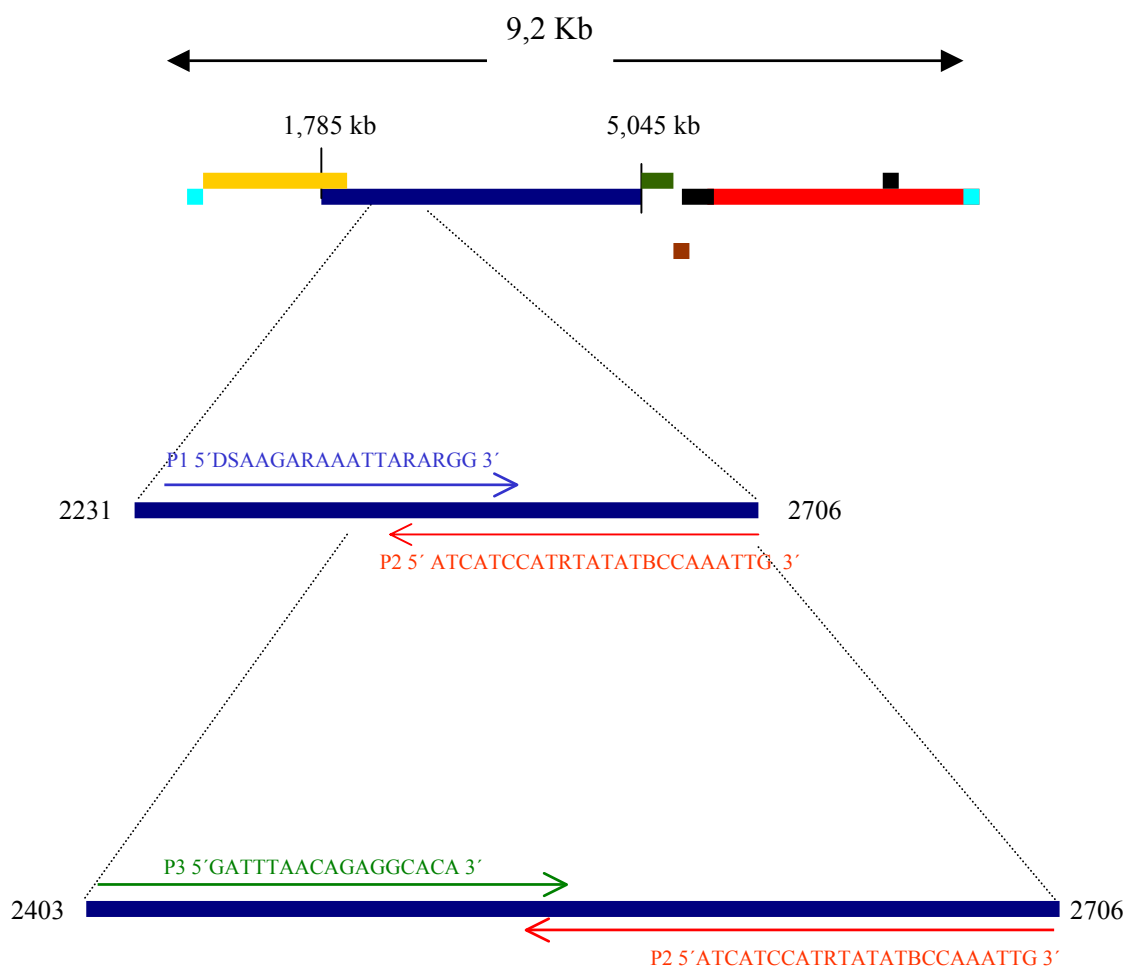


Figura 5: Esquema de la amplificación mediante PCR del gen *pol* según el protocolo descrito por Leroux *et al.* (1996).

### 3.3.3. PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO PARA LA PCR

Para infectar las células se utilizó el virus MVV like EV1 (aislado en la Universidad de Edimburgo por la Dra. J. Blacklaws), cedido por la Dra. Amorena de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

Las células utilizadas fueron fibroblastos provenientes de explantes de piel de la región inguinal de ovejas seronegativas, bien cedidos por la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, o bien obtenidos de corderos sacrificados en el matadero de Guadalix de la Sierra o en el matadero de Villalba (Madrid).

Para la obtención de los fibroblastos se cortaba una porción de unos 16 cm<sup>2</sup>, en condiciones de esterilidad. Después de lavarlos varias veces con PBS al que se había añadido antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina y anfotericina B), se fragmentaba el trozo de piel en cuadrados de unos 2 mm<sup>2</sup>, y se situaban cuatro fragmentos en una placa de Petri de plástico estéril en la que había 0,5 ml de suero fetal bovino. Tras una incubación de 24 horas se retiraba el trozo de piel y se añadían 15 ml de medio de cultivo completo (RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina y anfotericina B).

Para subcultivar las células se retiraba el medio y se lavaba la superficie celular con 5 ml de PBS. Posteriormente se añadía 1,5 ml de tripsina atemperada a 37°C y se dejaba actuar durante 5 minutos a 37°C para que se despegaran las células del sustrato. El contenido del frasco se vertía en un tubo y se centrifugaba a 1500 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular era resuspendido en 10 ml de medio haciendo una dilución 1:2.

Para infectar los fibroblastos se retiraba el medio de cultivo y se añadía un ml de una solución stock de MVV que se había almacenado a -70°C. Tras dejar que se adsorbiera durante una hora se añadía más medio de cultivo hasta completar 5 ml en el caso de T25 ó 10 ml en T75. Las células eran observadas diariamente con el microscopio invertido hasta la aparición de sincitios. Al día siguiente de apreciar los primeros sincitios las células se desprendían con tripsina y se extraía ADN según lo expuesto en el apartado 3.3.1.

### **3.3.4. SECUENCIACIÓN DE SECUENCIAS VÍRICAS.**

Los productos amplificados de determinadas muestras de sangre y leche fueron purificados con el kit de extracción de geles Alquick (Agen), tras correrlos en gel de agarosa, y se secuenciaron en el servicio de secuenciación de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB).

### **3.3.5. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS**

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es una herramienta informática utilizada para realizar búsquedas de secuencias lo más parecidas posibles, de acuerdo a criterios de similitud de secuencias, diseñada para poder analizar el contenido de las bases de datos de proteínas y nucleótidos.

### **3.3.6. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE ELISA**

El diagnóstico serológico se llevó a cabo mediante un kit para la detección de anticuerpos frente MVV en suero de oveja, el ELITEST # CK104A, producido por Hyphen Biomed., desarrollado y validado dentro del proyecto de la Unión Europea AIR3-CT94-1492.

Los pocillos de las microplacas de poliestireno están tapizadas con un péptido sintético y una proteína recombinante, derivadas de la envoltura de MVV y de la región *gag* respectivamente. La muestra de plasma o de leche se añade al pocillo tapizado, de tal modo que si contiene anticuerpos específicos (considerados como primer anticuerpo), se produce la reacción antígeno anticuerpo. Posteriormente se añaden como segundo anticuerpo inmunoglobulinas de conejo purificadas por afinidad frente a la IgG de la oveja marcadas con la enzima peroxidasa. Si ha existido reacción entre el primer anticuerpo y el antígeno, el segundo anticuerpo se unirá a ellos. La incubación subsiguiente con sustrato produce un color azul que torna a amarillo cuando se añade la solución de frenado a base de ácido sulfúrico. De este modo las muestras positivas desarrollan un color amarillo, mientras que en las negativas apenas se obviará un ligero color residual (Figura 6).

Se siguió el protocolo propuesto por el laboratorio comercial, diluyendo 1:100 las muestras de plasma y los controles positivos y negativos, y 1:10 las de leche, con el “diluyente de muestra” incluido en el kit, y añadiendo 20 µl de cada muestra diluida a un pocillo con 80 µl de diluyente de muestra. Los resultados se registraban a 450 nm en un lector de ELISA (Tecan Spectra Flúor) dentro de los 15 minutos siguientes a la adición de la solución de frenado.

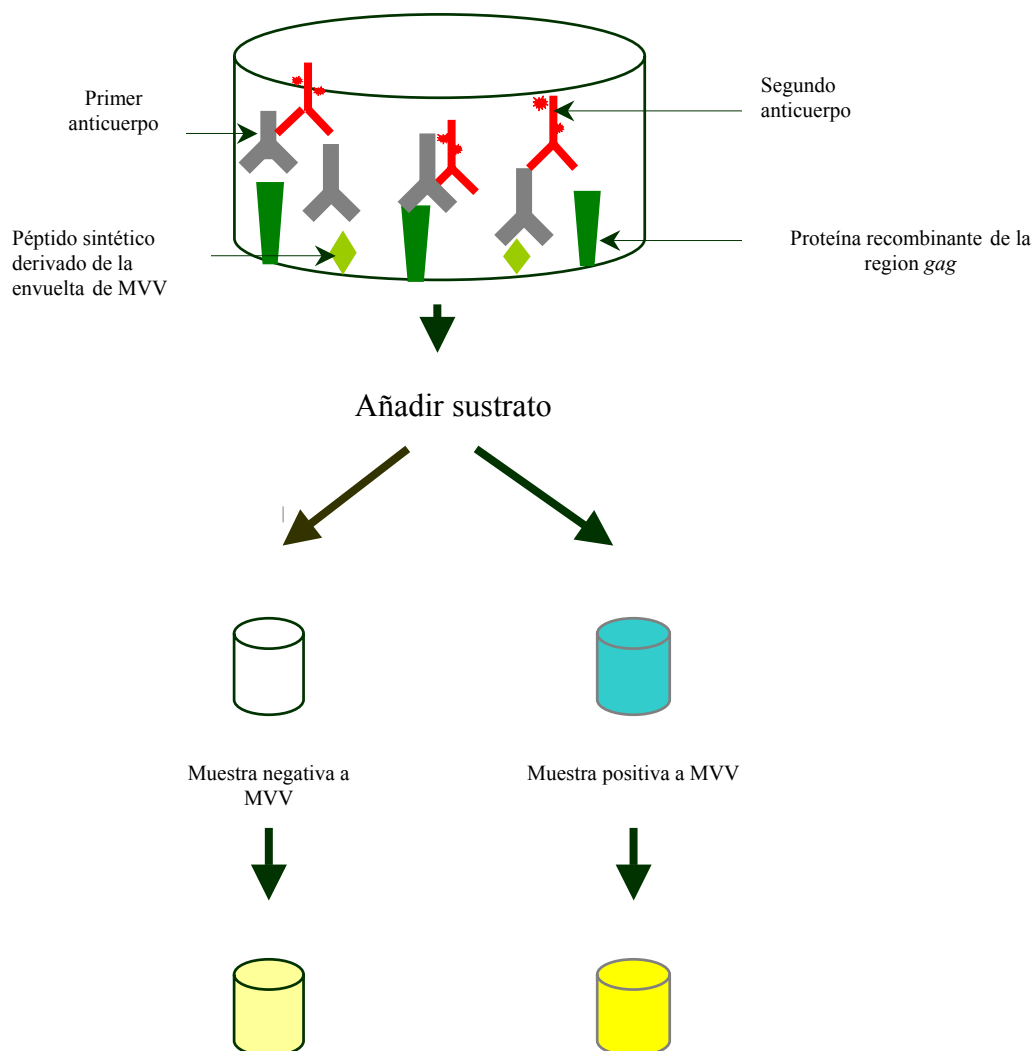


Figura 5: Detección de anticuerpos frente a MVV mediante técnica de ELISA.



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

“Seguimiento de la infección por MVV en una explotación de ganado ovino” surge de las preguntas sin respuesta de otro estudio con MVV anterior al nuestro en el Departamento de Sanidad Animal, en el que también se pretendía estudiar la evolución de la infección, pero, en donde las muestras procedían de individuos que ya no permanecían con vida y de periodos de tomas no constantes en el tiempo. Tras la elección al azar de una serie de animales, comenzamos nuestro estudio.

#### **4.1. DIFICULTADES ENCONTRADAS DURANTE LA TOMA DE MUESTRAS**

La primera dificultad que se nos presentó para poder comenzar nuestro estudio fue la de encontrar una explotación de ganado ovino, cuyas fichas de los animales estuvieran informatizadas. De este modo, además de obtener las muestras de leche y sangre requeridas y observar la sintomatología que pudieran presentar los animales, podríamos conocer la producción láctea, la edad y la raza de cada uno de los individuos, características muy importantes desde un punto de vista epidemiológico.

El primer día que realizamos la toma de muestras, se acopló un collar de tela negro a las cincuenta ovejas pertenecientes a nuestro estudio, con el fin de poder acceder a ellas con mayor facilidad en las siguientes visitas a la explotación. Este método de identificación prometía ser mucho mejor que el consistente en marcar a la oveja con cierto color de “spray”, pues era más duradero y no desaparecía con el esquileo. Sin embargo, a lo largo de todo el año que comprendió el estudio, varias ovejas dejaron de portar el collar, o éste apareció en ovejas que no estaban incluídas en el estudio. Las razones, tal y como nos explicó el dueño de la explotación, tenían su origen en los cuidadores del rebaño, que desconocían que las ovejas así marcadas formaran parte de nuestro trabajo. En algunas ocasiones se consiguió recuperar a los individuos, pues al ser ordeñadas debían pasar por una zona de lector de chip, pero en otras ocasiones, la búsqueda fue inútil. Así mismo una de las ovejas fue sacrificada, pues su edad y escasa productividad así lo requerían por parte de la explotación.

Otro problema con el que nos encontramos fue el que si bien durante la primera toma de muestras todas las ovejas se encontraban en lactación, al avanzar el tiempo, y

llegados al momento de llevar a cabo la cuarta toma, prácticamente todas las ovejas permanecían en el periodo de secado. Por ello, para próximos estudios en los que se pretenda conocer la evolución de cualquier agente infeccioso que pueda afectar al ganado lactopoyético, aconsejamos que los animales se encuentren desde un primer momento en distintos estados de producción.

Por último durante las visitas a la explotación que siguieron a la primera toma de muestra, los animales a muestrear no estaban separados del resto del rebaño, por lo que el equipo de campo requería más tiempo del estimado en realizar la toma de sangre y leche.

## 4.2. RESULTADOS DE PCR Y ELISA DE LAS MUESTRAS TOMADAS DURANTE EL ESTUDIO

La Tabla 4 resume y compara los resultados obtenidos por PCR y ELISA en sangre, leche procedente de mama izquierda y de mama derecha de cada animal muestreado a lo largo del tiempo.

Nº	RAZA	SANGRE					MAMA IZQUIERDA					MAMA DERECHA				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	Manchega	+	-	+	-	-	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
2	Manchega	+	-	-	-	+	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
3	Cruce F1	+	-	+	-	+	+	*	*	*	*	-	*	*	*	*
4	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
5	Manchega	-	-	-	-	-	-	+	-	*	-	-	-	-	*	-
6	Manchega	+	-	-	+	+	-	-	+	*	*	-	+	+/-	*	*
7	Cruce F1	+	+	-	-	-	-	+	-	*	*	-	+	-	*	*
8	Cruce F1	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
9	Manchega	-	-	-	-	+	-	-	-	-	*	+	-	-	-	*
10	Manchega	+	-	-	-	+	-	+	*	*	*	+	+	*	*	*
11	Cruce F1	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
12	Manchega	+/-	-	-	-	-	+	-	-	*	-	-	+	-	*	-
13	Cruce F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Manchega	-	+	-	-	+/-	-	+	-	*	-	-	+	+	*	-
15	Manchega	+/-	-	+	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
16	Manchega	+	+	-	-	-	+	+	*	*	*	-	+	*	*	*
17	Cruce F1	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	-	*	*	*
18	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*	-

19	Manchega	+	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	+/-	*	*
20	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	+	*	*	*
21	Manchega	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	-	*	*	*	-
22	Manchega	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
23	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-
24	Manchega	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	-	*	*	*	-
25	Cruce F1	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-
26	Manchega	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
27	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	+	-	*	-	-
28	Manchega	-	-	-	-	-	+	-	*	*	*	+	-	*	*	*
29	Manchega	-	-	-	-	-	+	-	-	*	-	-	-	-	*	-
30	Manchega	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	+	*	*	*	-
31	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
32	Manchega	+	+	-	-	+	-	-	*	*	*	-	+	*	*	*
33	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
35	Manchega	-	+/-	-	-	-	+	*	*	*	*	-	*	*	*	*
36	Manchega	+	-	-	-	-	-	-	-	*	*	+	-	-	*	*
37	Manchega	+/-	-	-	-	-	+	-	*	*	+	+	-	*	*	-
38	Manchega	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
39	Cruce F1	+	-	-	-	-	-	-	-	*	-	+	-	-	*	-
40	Manchega	-	-	+	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
41	Manchega	-	+	-	+	-	+	+	-	*	-	+	-	-	*	-
42	Manchega	+	-	-	-	-	+	-	-	*	-	+	-	-	*	-
43	Manchega	-	-	-	+	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*	+
44	Manchega	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	+	*	*	*	*
45	Manchega	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-
46	Manchega	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
47	Manchega	+	-	+	-	-	+	*	*	*	*	+	*	*	*	*
48	Manchega	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	*	+	-	-	-	*	+
49	Manchega	+	+	+	-	-	-	-	*	*	-	+	-	*	*	-
50	Manchega	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*

COLORES: REPRESENTAN LOS RESULTADOS DE LA TÉCNICA SEROLÓGICA (ELISA)

■ ELISA POSITIVO

□ ELISA NEGATIVO

■ OVEJA DESAPARECIDA

□ ELISA NO REALIZADO POR AUSENCIA DE MUESTRA DURANTE EL PERIODO DE SECADO

■ ELISA NO REALIZADO POR AGALAXIA POR INDURACIÓN

SIGNOS: REPRESENTAN LOS RESULTADOS DE LA TÉCNICA VIROLÓGICA (PCR)

+ PCR POSITIVO

- PCR NEGATIVO

\* NO REALIZADO POR AUSENCIA DE MUESTRA DURANTE EL PERIODO DE SECADO

Tabla 4: Resultados del estudio de MVV por comparación entre técnicas de PCR y ELISA.

#### 4.2.1. COMPARACIÓN DE MÉTODOS SEROLÓGICOS (ELISA) Y VIROLÓGICOS (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE MVV

##### Estado de infección en la población de origen

La población de partida presentaba las siguientes características: de un total de 50 animales muestreados, 11 presentaban anticuerpos frente a MVV en sangre y 39 no. De esos 11, 6 eran positivos a PCR y otros 5 no lo eran. De los 39 animales seronegativos al comienzo del estudio, 26 resultaron negativos a la prueba de PCR, 10 eran claramente positivos, y 3 dudosos (Tabla 5).

<b>RESULTADOS EN SANGRE TOMA 1</b>		<b>ELISA</b>		<b>TOTAL</b>
		+	-	
<b>PCR</b>	+	6 (12%)	10 (20%)	16 (34%)
	-	5 (10%)	26 (52%)	34 (66%)
	+/-	0	3 (6%)	
<b>TOTAL</b>		11 (22%)	39 (78%)	50 (100%)

Tabla 5: Detección de la infección por MVV en sangre de la población de origen

La presencia de 5 animales que resultan positivos a serología y negativos por la técnica de PCR, aunque parece un hecho paradójico, ocurre en la mayoría de los estudios realizados con MVV (Celer *et al.*, 1999; Kuzmak *et al.*, 2003). Brodie *et al.* (1992) sólo pudieron hallar ADN proviral en células mononucleares de sangre periférica en 50% de animales seropositivos, mientras que otros estudios lograron un gran éxito, pues se consiguió encontrar ADN proviral en un 94,7% de un total 98 animales (Barlough *et al.*, 1994). La causa más probable por la que no se detecta el ADN proviral radica en que estos animales seropositivos pero PCR negativos presentan un bajo nivel de infección, por lo que la cantidad de ADN que pudiera incluirse en la reacción de amplificación estaría muy limitada (Celer *et al.*, 1999). El cultivo de células es un método de alta sensibilidad que podría resolver este problema de falta de ADN proviral en cantidades suficientes, pero para llevarlo a cabo se requiere mucho tiempo y

trabajo, por lo que la PCR, el método que nosotros hemos utilizado, se considera la alternativa más eficiente (Brodie *et al.*, 1993; Ramstad *et al.*, 1993). Otra posible causa por la que no se detecta el virus por PCR podría ser que, al igual que en otros retrovirus como FeLV, se produjera un secuestro de las células infectadas, incluso en la mama o a nivel articular, de tal forma que aunque existieran en el interior del organismo afectado, no aparecerían ni en sangre ni en leche. En cuanto a la posible falta de sensibilidad de la PCR, la técnica elegida, descrita por Leroux *et al.* (1996), amplifica una secuencia en el gen *pol*, que se considera como altamente conservado, y por tanto, deberíamos descartar posibles mutaciones en esta región.

También resulta sorprendente a simple vista que 10 de los animales seronegativos resultaran positivos a la técnica de PCR. Sin embargo, no debemos olvidar que el método de PCR permite realizar el diagnóstico directo de la infección de forma temprana, antes incluso de que aparezca la respuesta inmune.

En cuanto al estudio de la infección en leche, de un total de cincuenta animales sólo pudimos estudiar la infección por MVV en mama izquierda en cuarenta y ocho, pues dos de ellos presentaban induración en la misma. Así pues de un total de 48 muestras de leche procedente de mama izquierda, diez presentaron anticuerpos mientras que treinta y ocho resultaron ser ELISA negativos. De entre los 10 serológicamente positivos, 4 eran PCR positivos y 6 PCR negativos, mientras que de los 38 que no presentaron anticuerpos, 30 fueron PCR negativos y 8 PCR positivos (Tabla 6).

RESULTADOS LECHE MAMA IZQUIERDA TOMA 1		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	4 (8,5%)	8 (16,5%)	12 (22,8%)
	-	6 (12,5%)	30 (62,5%)	36 (77,2%)
TOTAL		10 (21%)	38 (79%)	48(100%)

Tabla 6: Detección de la infección por MVV en leche procedente de mama izquierda en la población de origen.

Se obtuvo leche procedente de mama derecha de las 50 ovejas muestreadas, y observamos que 8 de los animales presentaron anticuerpos en la mama derecha mientras que otras 42 ovejas no. De entre las serológicamente positivas, 3 eran PCR negativas y 5 PCR positivas. De los 42 animales seronegativos 32 eran PCR negativos y 10 PCR positivos (Tabla 7).

RESULTADOS MAMA DERECHA TOMA 1		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	5 (10%)	10 (20%)	15 (30%)
	-	3 (6%)	32 (64%)	35 (70%)
TOTAL		8 (16%)	42 (84%)	50(100%)

Tabla 7: Detección de la infección por MVV en leche procedente de mama derecha en la población de origen.

También parece paradójico encontrar entre las ovejas positivas a anticuerpos en leche, animales negativos a PCR. Al igual que en sangre la causa puede ser debida al bajo nivel de infección por MVV, aunque también a la presencia de contaminantes inhibitorios en leche, o a la emisión intermitente en leche de células infectadas con MVV (Vitu *et al.*, 1997).

De entre las ovejas que carecían de anticuerpos detectables en leche por el método de ELISA, había animales en los que se detectó la presencia de virus por técnica de PCR. Ello puede ser debido a que el virus se haya detectado en un estadio temprano de la infección, o a que la seroconversión en ese animal resulte tardía, o bien que, a pesar de que la técnica de ELISA comercializada por Hyphen Biomed se considera adecuada para la detección de anticuerpos en leche, estos podrían ser de la clase IgA y no detectarse por los reactivos incluidos en el kit.

Para poder discutir sobre la correlación entre la infección en sangre y en leche al inicio del estudio debemos señalar que de un total de 50 ovejas, 13 presentaban anticuerpos frente a MVV en la leche procedente de al menos una mama. La infección bilateral ocurría en 6 casos (ovejas 7, 22, 27, 28, 38, 41), la unilateral en 5 (32, 36, 42, 49 y 50) y el animal nº 33 presentó anticuerpos en leche procedente de la mama derecha pero padecía una induración en la mama izquierda por lo que no pudimos comprobar si la infección era bilateral o unilateral.

Todas las ovejas con infección mamaria bilateral, a excepción de la oveja 22, presentaron al mismo tiempo anticuerpos en sangre, incluso la oveja 33 cuya leche en mama derecha era serológicamente positiva pero presentaba una induración en la izquierda. En cambio, de las cinco ovejas con infección unilateral sólo tres también presentaban anticuerpos en sangre. Es decir que la infección mamaria bilateral se encuentra en estrecha relación con la presencia de anticuerpos en sangre.

#### Correlación entre métodos serológicos (ELISA) y virológicos (PCR)

La capacidad de determinar el estado real respecto a una enfermedad es muy difícil, por lo que aplicamos dos pruebas distintas, ELISA y PCR, cuyos valores predictivos se suponen lo suficientemente buenos como para pensar que los resultados que se obtienen con su uso se acercan a la realidad. Por ello evaluamos el índice estadístico kappa, que tiene en cuenta las concordancias debidas al azar.

RESULTADOS EN SANGRE TOMA 1		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	A	C	A+C
	-	B	D	B+D
TOTAL		A+B	C+D	A+B+C+D

Concordancia observada =  $(A+D) / 100$

Concordancia esperada= concordancia de que las pruebas sean positivas + concordancia de que las pruebas sean negativas

Concordancia esperada de que ambas pruebas sean positivas =  $[(A+C)/100] \times [(A+B)/100]$

Concordancia esperada de que ambas sean negativas =  $[(B+D)/100] \times [(C+D)/100]$



Concordancia potencial = 1- concordancia esperada

Tabla 8: Tabla explicativa de concordancia entre la prueba de ELISA y PCR

$$K = \frac{(\text{concordancia observada} - \text{concordancia esperada})}{\text{concordancia potencial}}$$

El esquema se presenta en la Tabla 8. De este modo procederemos a estudiar la concordancia para detectar la infección por MVV en sangre y leche que existe entre las pruebas de ELISA y PCR.

a. Resultados de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para muestras de sangre.

RESULTADOS EN SANGRE TOMA 1		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	6 (13%)	10 (21%)	16 (34%)
	-	5 (10%)	26 (56%)	31 (66%)
TOTAL		11 (23%)	36 (77%)	47 (100%)

$$K = \frac{0,32 - 0,13}{0,87} = 0,22$$

CONCORDANCIA DÉBIL

Tabla 9: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR en las muestras de sangre obtenidas el 27/11/02 (Toma 1), tras omitir 3 animales ELISA negativos que resultaron PCR dudosos.

RESULTADOS EN SANGRE TOMA 2		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	4 (9%)	2 (5%)	6 (13%)
	-	6 (13%)	33 (73%)	39 (87%)
TOTAL		10 (22%)	35 (78%)	45 (100%)

$$K = \frac{0,37 - 0,142}{0,86} = 0,21$$

CONCORDANCIA DÉBIL

Tabla 10: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR en las muestras de sangre obtenidas el 06/02/03 (Toma 2), tras omitir 4 animales desaparecidos y 1 animal ELISA negativo y dudoso a la técnica de PCR.

RESULTADOS EN SANGRE TOMA 3		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	2 (5%)	5 (11%)	7 (16%)
	-	8 (19%)	29 (66%)	37 (84%)
TOTAL		10 (23%)	34 (77%)	44 (100%)

$$K = \frac{0,31 - 0,13}{0,87} = 0,20$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 11: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR en las muestras de sangre obtenidas el 22/04/03 (Toma 3), tras omitir 5 animales desaparecidos y 1 animal ELISA negativo y dudoso a PCR.

RESULTADOS EN SANGRE TOMA 4		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	1 (2%)	2 (5%)	3 (7%)
	-	12 (28%)	29 (65%)	41 (93%)
TOTAL		13 (30%)	31 (70%)	44 (100%)

$$K = \frac{0,30 - 0,13}{0,87} = 0,19$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 12: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR en las muestras de sangre obtenidas el 22/07/03 (Toma 4), tras omitir 6 animales desaparecidos.

RESULTADOS EN SANGRE TOMA 5		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	2 (5%)	4 (10%)	6 (15%)
	-	8 (19%)	28 (66%)	36 (86%)
TOTAL		10 (24%)	32 (76%)	42 (100%)

$$K = \frac{0,30 - 0,12}{0,88} = 0,20$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 13: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR en las muestras de sangre obtenidas el 06/10/03 (Toma 5), tras omitir 7 animales desaparecidos y 1 animal ELISA negativo y de resultado dudoso por PCR.

- b. Resultados de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para muestras de leche procedentes de mama izquierda.

RESULTADOS LECHE MAMA IZQUIERDA TOMA 1		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	4 (8%)	8 (17%)	12 (25%)
	-	6 (13%)	30 (62%)	36 (75%)
TOTAL		10 (21%)	38 (79%)	48 (100%)

$$K = \frac{0,34 - 0,14}{0,86} = 0,23$$

CONCORDANCIA DÉBIL

Tabla 14: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para las muestras de leche obtenidas el 27/11/02 (Toma 1), tras omitir 2 animales que presentaron induración en la mama izquierda.

RESULTADOS LECHE MAMA IZQUIERDA TOMA 2		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	2 (6%)	4 (12%)	6 (18%)
	-	6 (17%)	22 (65%)	28 (82%)
TOTAL		8 (23%)	26 (77%)	34 (100%)

$$K = \frac{0,24 - 0,078}{0,92} = 0,17$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 15: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para las muestras de leche obtenidas el 06/02/03 (Toma 2), tras omitir 4 animales desaparecidos y 12 animales en periodo de secado.

RESULTADOS LECHE MAMA IZQUIERDA TOMA 3		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	0	1 (5%)	1 (5%)
	-	4 (18%)	17 (77%)	21 (95%)
TOTAL		4 (18%)	18 (82%)	22 (100%)

$$K = \frac{0,17 - 0,038}{0,96} = 0,14$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 16: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para las muestras de leche procedentes de mama izquierda obtenidas el 22/04/03 (Toma 3), tras omitir 5 animales desaparecidos y 23 animales en periodo de secado.

RESULTADOS LECHE MAMA IZQUIERDA TOMA 5		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	0	2 (11%)	2 (11%)
	-	4 (22%)	12 (67%)	16 (89%)
TOTAL		4 (22%)	14 (78%)	18 (100%)

$$K = \frac{0,12 - 0,023}{0,98} = 0,10$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 17: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para las muestras de leche procedentes de mama izquierda obtenidas el 06/10/03 (Toma 5), tras omitir 7 animales desaparecidos y 25 en periodo de secado.

c. Resultados de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para muestras de leche procedentes de mama derecha.

RESULTADOS MAMA DERECHA TOMA 1		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	5 (10%)	10 (20%)	16 (30%)
	-	3 (6%)	32 (64%)	34 (70%)
TOTAL		8 (16%)	42 (84%)	50 (100%)

$$K = \frac{0,37 - 0,16}{0,84} = 0,25$$

CONCORDANCIA DÉBIL

Tabla 18: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para las muestras de leche procedente de mama derecha obtenidas el 27/11/02 (Toma 1).

RESULTADOS MAMA DERECHA TOMA 2		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	3 (10%)	4 (13%)	7 (23%)
	-	5 (16%)	18 (60%)	23 (76%)
TOTAL		8 (26%)	22 (73%)	30 (100%)

$$K = \frac{0,21 - 0,056}{0,94} = 0,16$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 19: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para las muestras de leche procedente de mama derecha obtenidas el 06/02/03 (Toma 2), tras omitir 4 animales desaparecidos y 12 en periodo de secado.

RESULTADOS MAMA DERECHA TOMA 3		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	0	2 (10%)	2 (10%)
	-	3 (15%)	15 (75%)	18 (90%)
TOTAL		3 (15%)	17 (85%)	20 (100%)

$$K = \frac{0,15 - 0,031}{0,97} = 0,12$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 20: Resultado de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para las muestras de leche procedente de mama derecha obtenidas el 22/04/03 (Toma 3), tras omitir 5 animales desaparecidos, 23 en periodo de secado, y 2 animales ELISA negativo y de resultado dudoso a PCR.

RESULTADOS MAMA DERECHA TOMA 5		ELISA		TOTAL
		+	-	
PCR	+	0	2 (11%)	2 (11%)
	-	4 (22%)	12 (67%)	16 (89%)
TOTAL		4 (22%)	14 (78%)	18 (100%)

$$K = \frac{0,12 - 0,023}{0,98} = 0,10$$

CONCORDANCIA MUY DÉBIL

Tabla 21: Resultados de concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para las muestras de leche procedente de mama derecha obtenidas el 06/10/03 (Toma 5), tras omitir siete animales desaparecidos y veinticinco en periodo de secado.

Los valores Kappa obtenidos (Tabla 9-21) indican que la concordancia entre las pruebas de PCR y ELISA para sangre o leche es de débil a muy débil. Generalmente la técnica por PCR puede ser más sensible que los métodos serológicos, aunque existen artículos en los que, al igual que en nuestro estudio, se observa una débil concordancia entre PCR y serología, sobre todo cuando la detección de la porción amplificada se realiza por electroforesis en geles con bromuro de etidio (Kuzmak *et al.*, 2003).

Al utilizar ambas pruebas, la especificidad es alta, es decir la proporción de falsos positivos es muy baja. De este modo, al utilizar ambas pruebas, es muy difícil que creamos que está infectada una oveja que no lo está. Dicho de otro modo, la probabilidad de que un animal no infectado con MVV resulte negativo a ambas pruebas es muy alta.

#### **4.2.2. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN A LO LARGO DEL TIEMPO**

En cuanto a la evolución de la infección por MVV en el tiempo se observa que de todas las ovejas muestreadas, algunas nunca fueron infectadas, o por lo menos no resultaron positivas ni a la presencia de anticuerpos ni a la reacción en cadena de la polimerasa durante todo el estudio; otras fueron positivas a PCR en algún momento del estudio, pero algunas desarrollaron seroconversión y otras no. Así mismo, las ovejas 33 y 44 presentaron induración de la mama izquierda por lo que no fue posible extraer leche de ellas para el estudio, y durante la cuarta toma de muestras la mayoría de los animales se encontraron en periodo de secado. Además algunos animales desaparecieron durante el estudio, por lo que carecemos de las muestras correspondientes, y el estudio de la evolución de la enfermedad se ve truncado.

Doce ovejas (nº 11, 13, 17, 18, 21, 23, 24, 25, 31, 34, 45, y 46) no fueron infectadas por el virus de MVV en todo el tiempo que duró el estudio pues no proporcionaron un resultado positivo ni por la técnica de ELISA ni por PCR, tanto en sangre como en leche. Si tenemos en cuenta que al comenzar el estudio eran dieciocho las ovejas que resultaron negativas a todas las pruebas laborales, podemos afirmar que la transmisión del virus se efectúa de una forma rápida y eficaz. Podemos suponer que las 14 ovejas mencionadas nunca se infectaron ya que, tal y como indican Brahic y Haase (1981) y posteriormente Morin *et al.* (2004), una vez que se forman los anticuerpos, éstos suelen permanecer a lo largo de toda la vida del animal, a pesar de que esta no fue nuestra observación, como se describe en el apartado 4.2.3. Al comparar las edades y datos productivos de los animales vemos que las edades oscilan entre los dos y siete años, la producción entre 0,77 litros diarios y 1,22, e incluso hay animales de raza manchega y cruce (Tabla 25). Ninguno de los factores que conocemos son lo suficientemente orientativos como para afirmar que la edad, producción o raza son los factores que han conferido resistencia a ser infectados a estos animales. Por lo tanto debe existir algún factor no contemplado en nuestro estudio que podría aclarar la resistencia que presentan estos individuos frente a contraer la enfermedad de MVV.

En cinco ovejas (7, 32, 41, 47 y 49) detectamos MVV por PCR en dos momentos distintos del periodo de estudio, separados al menos por dos meses y medio, y presentaron anticuerpos en sangre. Un animal serológicamente positivo puede resultar PCR negativo cuando la cantidad de células infectadas o la cantidad de ADN proviral que pueda haber en ellas sea insuficiente, o cuando las células infectadas queden inmovilizadas en alguna localización orgánica, como se expuso en el apartado anterior. Sin embargo, ¿por qué ocurre la aparición y desaparición de estos altos niveles de virus en células sanguíneas? Tal y como indican Vitu *et al.* (1997), es posible que ocurra la emisión intermitente de células infectadas con MVV en leche, e incluso según creemos, podría ocurrir lo mismo en sangre al quedar las células infectadas con MVV “secuestradas”, por ejemplo, en los ganglios linfáticos, al igual que ocurre en otros retrovirus como FeLV. Morin *et al.* (2004) estudiaron la evolución de la expresión viral y la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) en sangre de dos cabras infectadas con un clon de CAEV, un virus muy similar a MVV. Reactivaron el virus por inducción hormonal de la lactación (Outzrout y Lerondell, 1990) y observaron un aumento de la cantidad de ADN proviral en células sanguíneas desde los 13 días a los 27 días post-inducción. El pico de ADN proviral disminuía inmediatamente después hasta niveles indetectables en una de las cabras, debido a la actividad de los linfocitos T CD8+ sobre las células infectadas, pero detectables de forma variable en la otra. A los dos meses siguientes a la inducción, no se observaba ADN proviral en la sangre de ninguna de las dos cabras. Sin embargo, en nuestro caso la reactivación del virus no se debe al comienzo de la lactación, puesto que en la mayoría de las ocasiones ocurre durante el periodo de secado de los animales, y los niveles detectables de ADN proviral se mantienen hasta más allá de dos meses. Debemos preguntarnos por qué los niveles de ADN proviral en sangre vuelven a aumentar, o qué cambia en la respuesta inmune para que ésta deje de ser tan efectiva como era. En nuestra opinión ello se debe a la capacidad de mutar del virus, pues las tasas de mutación en retrovirus son de  $10^5$ – $10^6$  veces superiores a la de las células hospedadoras (Dogherty *et al.*, 1983; Roberts *et al.*, 1988). Según nuestra hipótesis el virus, al mutar, elude la respuesta inmune, y es capaz de penetrar en la célula, replicarse, y aumentar los niveles de virus en sangre, hasta que la respuesta inmune es capaz otra vez de producir una acción tal, que mantenga bajo control la infección. Andrésdottir (2003) sugirió que la recombinación puede contribuir a la alta incidencia de variedad antigénica en MVV, ya que es un hecho muy frecuente en el gen *env*, lo cual explicaría la aparición y desaparición de los niveles de viremia en

el tiempo. Para poder comprobar nuestra teoría sería necesario realizar otro estudio en el que se analizaran las secuencias de una zona semiconservada de la región *env*.

Por otro lado, hubo 18 ovejas negativas por ELISA que fueron positivas por PCR: 9 lo fueron una vez (12, 19, 26, 35, 37, 39, 40, 42 y 43) y otras 9 ovejas (1, 2, 3, 6, 10, 14, 15, 16, y 48) fueron positivas por PCR en sangre durante más de un periodo del estudio. Tal y como indican Harkiss y Watt (1990), los métodos serológicos no son suficientes para detectar a todos los animales infectados debido a que existe un periodo de seroconversión post-infección en el que no detectamos la infección y a que algunos animales pueden ser seronegativos temporalmente durante meses e incluso años. Varios de los animales mencionados no habían seroconvertido al menos un año después de ser detectados como PCR positivos. Todos los autores coinciden en que es muy común que se produzca una seroconversión tardía, pero no explican la razón. Nosotros planteamos dos teorías:

La primera podría basarse en que la respuesta humoral, o mejor dicho, la ausencia de ella, se debe a alguna característica inmunológica común en individuos infectados.

La segunda se basaría en las características propias del virus, que impiden la formación de anticuerpos, por algún método de escape, por ejemplo, no expresándose en la superficie de la célula hospedadora.

En cualquier caso, parece ser que no se llega a producir una respuesta inmune humoral quizás porque se produce una respuesta celular muy rápida y potente, que mantendría bajo control al virus durante cierto tiempo, y que no daría tiempo suficiente para que apareciera una respuesta humoral.

La Tabla 22 muestra la detección de la infección de MVV en todos los animales en estudio por PCR y su evolución a lo largo de un año. Como podemos observar en las muestras de sangre, el número de las mismas en las que se detectó ADN proviral varían de forma considerable a lo largo del estudio, de tal forma que al principio se detecta un gran número de animales positivos por la técnica de PCR, que va decreciendo hasta la



cuarta toma demuestras, y vuelve a aumentar en la quinta toma. Ello puede ser debido a que, como hemos comentado con anterioridad, el organismo desarrolla una respuesta celular o humoral que mantiene bajo control la infección, pero con el transcurso del tiempo, el virus es capaz de mutar, evitar a la respuesta inmune, y volver a infectar a sus células diana, de tal modo que volvemos a detectar el ADN proviral por PCR. Por otra parte, también podría ser un efecto estacional por factores no definidos.

Fecha	Toma	Desaparecidas	Secado	Agalaxia MI	Sangre			Mama Izda			Mama Drch		
					+	-	+/-	+	-	+/-	+	-	+/-
27-11-02	1	0	0	2	16	31	3	11	37	0	15	35	0
6-2-03	2	4	12	0	6	39	1	6	28	0	9	25	0
22-4-03	3	5	23	0	6	38	1	1	21	0	2	18	2
22-7-03	4	6	42	0	4	39	1	1	1	0	1	1	0
6-10-03	5	7	25	0	6	36	1	2	16	0	2	16	0

Tabla 22. Resumen de los resultados obtenidos por PCR en sangre y leche de los animales muestreados a lo largo de un año. MI: mama izquierda.

Además, al comparar por el método de PCR la presencia de virus en sangre y leche se observó que muchas ovejas fueron positivas a la infección por sangre con anterioridad que por leche. Tan sólo debemos fijarnos en las ovejas 1, 2, 6, 7, 15, 19, 32, 40, 43 para afirmar que el origen de la infección es sistémica.

En algunos casos se observa simultáneamente en sangre y mama positividad por PCR al virus, tal es el caso de las ovejas 3, 10, 12, 14, 16, 36, 37, 38, 39, 42, 47 y 49. Todos estos animales (excepto el nº 14) fueron positivos en la primera toma, por lo que desconocemos en cual de las dos localizaciones se detectó el ADN proviral antes. Sólo en algunos casos, que coinciden en su mayoría con animales de seroconversión tardía o respuesta humoral ineficaz, ocurre que aparece la infección antes en leche que en sangre (4, 5, 9, 20, 22, 26, 27, 28, 29, 35, 41, y 44),.

### 4.2.3. SEGUIMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Si observamos la respuesta serológica del animal frente a la infección en lugar de los datos virológicos (Tabla 4), los anticuerpos frente a MVV aparecen con anterioridad o simultáneamente en sangre que en leche en todos los animales (4, 5, 7, 8, 9, 20, 27, 28, 32, 33, 36, 38, 40, 41, 47, 49) salvo en 3 casos (ovejas 22, 42, 50) en los que además se observan anticuerpos de forma esporádica o intermitente. Es decir, los anticuerpos pasan desde vía sistémica hacia mama, y en muy pocas ocasiones al revés. Además parece ser, tal y como se observa en la oveja 42, que la intermitencia en la aparición de anticuerpos en leche desaparece para hacerse constante, una vez que los anticuerpos se observan en sangre.

A lo largo del estudio seroconvirtieron pocos animales (nº 4, 5, 8, 9, 40, 42, y 50), mientras que 12 fueron positivos desde el principio (7, 20, 22, 27, 28, 32, 33, 36, 38, 41, 47 y 49).

La respuesta inmune hacia la infección por MVV que presentaron cada una de las ovejas en estudio difería de tal modo que pudimos observar y clasificar distintos comportamientos humorales frente a la infección en sangre que podían clasificarse desde muy eficaces hasta inexistentes:

- a) Respuesta inmune humoral muy eficaz: se trata de una respuesta inmune muy típica en los animales que son infectados por primera vez con MVV. Tras la infección se produce un pico de ADN proviral que desciende al aparecer la respuesta inmune, de tal modo que la infección queda controlada. Se caracteriza por un pico de ADN proviral detectable por PCR que no vuelve a observarse si dos meses después aparecen anticuerpos frente al virus (ovejas 20, 27, 28, 33 y 40).
- b) Respuesta inmune humoral eficaz pero retardada: podría ser el caso de la oveja nº 42, en el que una vez que se observan anticuerpos por la técnica de ELISA, no se vuelve a detectar ADN proviral en el

organismo. La diferencia con el caso anterior, es que esta respuesta inmune tarda más de dos meses en aparecer.

- c) Respuesta inmune humoral ineficaz: la presencia de anticuerpos no impide la detección al mismo tiempo del virus mediante la técnica de PCR. Esto ocurre en las ovejas 7, 9, 32, 36, 38, 41, 47, 49, por lo que parece que la respuesta inmune no es capaz de controlar la infección y el virus continúa infectando cada vez a más células.
- d) Respuesta inmune humoral inexistente: en este caso los animales son positivos a la técnica de PCR pero nunca desarrollaron una respuesta humoral. Es interesante observar que la mayoría de las ovejas de nuestro estudio (1, 2, 3, 6, 10, 12, 14, 15, 16, 19, 26, 35, 37, 39, 43, 48) presentan este comportamiento hacia la infección. Este hecho se ha descrito en otros estudios (Rimstad *et al.*, 1993) en donde se habla de animales que no desarrollan anticuerpos o seroconvierten meses e incluso años después de la infección. Sin embargo, no podemos tener certeza de que estos animales hayan sido infectados.

Fecha	Toma	Desaparecidas	Secado	Agalaxia MI	Sangre		Mama Izd		Mama Drch	
					+	-	+	-	+	-
27-11-02	1	0	0	2	11	39	10	38	8	42
6-2-03	2	4	12	0	10	36	8	26	8	26
22-4-03	3	5	23	0	10	35	4	18	3	19
22-7-03	4	6	42	0	12	32	0	2	0	2
6-10-03	5	7	25	0	10	33	4	14	4	14

Tabla 23: Resumen de la respuesta humoral de los animales muestreados a la infección por MVV a lo largo de un año.

Como podemos observar a partir de la Tabla 23, la respuesta inmune es muy constante a lo largo del tiempo, la infección de MVV es de por vida y una vez que se

han formado anticuerpos éstos persisten a lo largo de la vida del animal. Las variaciones que observamos en la gráfica en cuanto a cantidad de animales ELISA positivos en leche, se deben fundamentalmente a la entrada de los animales infectados en el periodo de secado. Aún así, podemos observar que las ovejas 8, 22, 36, 40, y 42 sufren irregularidades en cuanto a la detección de los anticuerpos se refiere, pues no se mantienen en el tiempo. Este es un hecho que sólo Pepin *et al.* (1998) mencionan en una revisión bibliográfica sin indicar en qué otro estudio se habían basado.

#### **4.2.4. PREVALENCIA DE MVV EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA**

A la vista de los resultados expresados anteriormente es obvio que el diagnóstico de la infección por MVV es sumamente complicado por la inconsistencia en la presencia de ADN proviral, y porque los anticuerpos pueden aparecer y desaparecer. Dado que la mayor parte de los animales que han resultado positivos a PCR y/o a ELISA lo han sido en sangre y en leche en algún momento del estudio aunque no necesariamente de forma simultánea, podemos sugerir que el ser positivo a cualquiera de las dos pruebas bien en sangre o bien en leche es indicativo de infección por MVV.

En este sentido, 12 animales fueron negativos a las dos pruebas a todo lo largo del estudio (11, 13, 17, 18, 21, 23, 24, 25, 31, 34, 45, 46), por lo que la prevalencia final fue del 76% (Tabla 24). La prevalencia al inicio del estudio fue del 64%, por lo que un total de 6 animales (4, 5, 8, 14, 40 y 43) fueron infectados a lo largo del año, considerando que las ovejas 13 y 25 que desaparecieron en la quinta toma no hubieran sido infectadas. Es decir, la incidencia de la infección por MVV fue del 12% en este estudio.

Sin embargo, pocos animales fueron consistentemente positivos por PCR o por ELISA en sangre o en leche en todas las tomas del estudio, lo que implica que es conveniente realizar exámenes repetidos en la población ovina, incluyendo al menos dos pruebas diagnósticas, para determinar con exactitud el estado de la infección en la población ovina por este retrovirus tan evasivo.

TOMA DE MUESTRA	PREVALENCIA	ANIMAL
INICIAL	64%	1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 15, 16, 20, 22, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 47, 48, 49, 50
FINAL	76%	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 20, 22, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50

Tabla 24: Prevalencia inicial y final de la infección por MVV, teniendo en consideración tanto la detección de anticuerpos como de ADN proviral.

### 4.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN POR MVV SOBRE LA PRODUCCIÓN LÁCTEA

España es el segundo país con mayor censo en ganado ovino de la Unión Europea y produce el 14% de la leche ovina para la misma. El mayor productor nacional es Castilla-León, responsable del 67%, y a continuación Castilla la Mancha con un 23%; de ahí la importancia de estudiar las enfermedades como MVV que pueden producir descensos importantes en la producción.

Las tablas 25 y 26 muestran la relación entre la presencia de anticuerpos y el virus de MVV en mama por técnica de ELISA y PCR respectivamente, el estado productivo de cada uno de los animales muestreados, y la presencia de mamitis mediante CMT.

En este estudio se observa que no existe ninguna relación entre la presencia simultánea de anticuerpos o de virus en leche y la mamitis subclínica, pues de un total de 48 muestras de leche que presentaban anticuerpos frente a MVV sólo 12 eran al mismo tiempo CMT positivas. Así mismo, de un total de 43 muestras de leche PCR positivas sólo 12 eran positivas por CMT. Estos resultados discrepan con los obtenidos en un estudio sobre la “Etiología y prevalencia de mamitis subclínica en la oveja manchega a mitad de la lactación”, de De la Cruz *et al.* (1994) en donde se observaron un total de 14 ovejas seropositivas a MVV, de las cuales 11 también presentaban

infección bacteriana. Sin embargo, en este estudio además de aplicarse la prueba de CMT se llevaron a cabo ensayos bacteriológicos, el recuento de células somáticas y el uso de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAGasa), métodos a los que nosotros no hemos tenido acceso, y que sin duda mejoran las posibilidades de detectar a los animales con mamitis. En contraposición, Van der Molen *et al.* (1985), observaron que la incidencia de glándulas mamarias bacteriológicamente infectadas era menor en las ovejas con Maedi que en las que no existía infección por el virus.

Sin embargo, si observamos la evolución a lo largo del tiempo, podemos decir que de un total de 22 animales que presentaron en algún momento del estudio un resultado positivo al CMT, 17 fueron detectados como PCR positivos en mama (5, 6, 7, 10, 14, 16, 22, 26, 28, 32, 36, 38, 41, 42, 43, 44, 49), mientras que 5 fueron siempre PCR negativos (8, 17, 18, 23, 45).

En cuanto a la comparación entre presencia de mamitis y presencia de anticuerpos frente a MVV en leche observamos que de 22 animales positivos en algún momento del estudio a la prueba de CMT, 14 nunca presentaron anticuerpos en leche (6, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 23, 24, 26, 37, 40, 43, 44) y 8 sí los presentaron (5, 7, 22, 28, 36, 41, 49). Como hemos mencionado en el apartado 4.2.3, la mayoría de los animales muestreados presentan una respuesta humoral ineficaz o una carencia de respuesta humoral en presencia de ADN proviral. Si observamos atentamente las tablas 25 y 26 podemos comprobar que casi todos los animales con respuesta inmune humoral ineficaz presentan mamitis en algún momento a lo largo del año. Este hecho reforzaría la teoría de que se produce una respuesta celular tan fuerte y temprana por parte del organismo que no da tiempo a desarrollar una respuesta humoral. Además esta potente respuesta celular tal y como indican Morin *et al.* (2004) se produce por LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos que destruirían las células infectadas con el virus presentes en la glándula mamaria, de tal forma que aumentarían el número de células en leche y se favorecería así la aparición de mamitis subclínica. La mamitis produce una concentración de linfocitos y células del sistema inmune, tales como macrófagos al lugar de infección mamario. De este modo, los macrófagos que estuvieran infectados por MVV llegarían de forma masiva a la glándula mamaria y al recoger la leche, habría una cantidad de células infectadas tal, que sería difícil no detectarlo por PCR, pero imposible casi de detectar anticuerpos mediante ELISA.

Si bien es cierto que una de las alteraciones que puede llegar a producir MVV es la mamitis indurativa, también lo es que la mayoría de los animales nunca llegan a manifestar de forma clínica esta patología. En nuestro estudio se observan dos ovejas (33 y 44) que presentan induración en la mama izquierda y que parecen estar infectadas con MVV pues una presenta anticuerpos en sangre y leche y otra resultó positiva a PCR en leche procedente de la mama no indurada.

La presencia de mamitis subclínica causada por la infección de MVV, no parece estar relacionada con una disminución de la producción láctea, aunque sí parece probable que las ovejas con mamitis sean las mejores productoras, pues la mayoría producen un litro o más de leche al día. En nuestro estudio, carecemos de una cantidad suficiente de animales para afirmar este hecho, aunque resulta ser una idea muy aceptada el que las ovejas de alta producción sean más susceptibles a mamitis que las de menor producción (Marco *et al.*, 1991).

	DATOS DE PRODUCCIÓN						MAMA IZQUIERDA					MAMA DERECHA				
	EDAD	RAZA	PART	DÍAS LACT.	LITROS	L/D	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1.	5	Manchega	5	341	298	0,87	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
2.	ND	Manchega	ND	ND	ND	ND	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
3.	2	Cruce F1	3	154	80	0,51	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
4.	2	Manchega	2	103	118	1,14	-	-	-			-	-	-		
5.	4	Manchega	6	495	464	0,93	-	-	+++	*		-	-	-	*	
6.	5	Manchega	5	762	904	1,18	-	-	+	*	*	-		++	*	*
7.	2	Cruce F1	4	630	630	1,00	-	-	+++	*	*	-	-	-	*	*
8.	3	Cruce F1	2	201	239	1,18	-	-	++	*	*	-	-	-	*	*
9.	2	Manchega	1	177	225	1,77	-				*	-				*
10.	6	Manchega	7	1035	1076	1,03	-	-	*	*	*	+++	++	*	*	*
11.	2	Cruce F1	2	68	53	0,77	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
12.	6	Manchega	7	694	666	0,95	-	-	-	*		-	-	-	*	-
13.	3	Cruce F1	3	538	748	1,39	-		-			-		-		
14.	4	Manchega	4	508	479	0,94	-	-	-	*	+	-	-	-	*	-
15.	9	Manchega	11	3420	3420	1,00	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
16.	6	Manchega	8	563	450	0,79	++	+	*	*	*	-	*	*	*	*
17.		Cruce F1	5	480	480	1,00	-	+	*	*	*	-	-	*	*	*
18.	3	Manchega	4	177	160	0,90	-	*	*	*	+	-	*	*	*	-
19.	3	Manchega	2	160	185	1,15	-	-	-	*		-	-	-	*	*
20.	7	Manchega	9	706	592	0,83	-	-	*	*	*	-	-	*	*	*

21	3	Manchega	3	159	135	0,84	-	*	*	*	-	-	*	*	*	-
22	2	Manchega	3	190	193	1,01	++			-	++	++			-	+++
23	2	Manchega	3	268	284	1,05	-	++	+++	*	++	++	+	+	*	+
24	3	Manchega	4	302	332	1,09	-	*	*	*	-	-	*	*	*	+
25	2	Cruce F1	2	215	275	1,27	-	-	-	*		-	-	-	*	
26	7	Manchega	9	561	465	0,82	-	-		*	-	-	-		*	+
27	ND	Manchega	ND	ND	ND	ND	-	-	*			-	-	*		
28	7	Manchega	6	835	704	0,84	++	-	*	*	*	-	-	*	*	*
29	3	Manchega	2	236	237	1,0	-	-	-	*		-	-	-	*	
30	3	Manchega	3	538	748	1,39	-	*	*	*	-	-	*	*	*	-
31	4	Manchega	4	544	607	1,11	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
32	5	Manchega	6	694	701	1,01	-	+	*	*	*	-	++	*	*	*
33	5	Manchega	ND	ND	ND	ND	-					-				
34	3	Manchega	3	336	270	0,80	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
35	2	Manchega	4	60	60	1,00	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
36	2	Manchega	3	324	382	1,17	-	*	-	*	*	-	*	+	*	*
37	4	Manchega	4	199	160	0,80	-	-	*	*	-	-	-	*	*	+
38	7	Manchega	ND	ND	ND	ND	-	+				-	+			
39	2	Cruce F1	2	189	233	1,23	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-
40	7	Manchega	9	1135	1493	1,31	-	-	-	*	+	-	-	-	*	*
41	5	Manchega	5	374	422	1,12	-	-	-	*	-	-	++	+++	*	-
42	4	Manchega	4	411	396	0,96	-	+	++	*	-	-	-	-	*	+
43	7	Manchega	7	710	626	0,88	++		*	*		++	+	*	*	
44	4	Manchega	4	310	274	0,88		*	*	*	*	++	*	*	*	*
45	7	Manchega	7	783	957	1,22	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-
46	2	Manchega	3	1705	1110	0,65	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
47	5	Manchega	5	675	777	1,15	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
48	4	Manchega	5	468	470	1,00	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-
49	6	Manchega	7	641	580	0,90	-	-	*	*	++	-	+	*	*	+++
50	4	Manchega	3	61	31	0,5	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*

COLORES: REPRESENTAN LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS POR LA TÉCNICA ELISA

ELISA POSITIVO

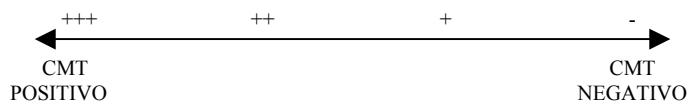
ELISA NEGATIVO

OVEJA DESAPARECIDA

AGALAXIA POR INDURACIÓN MAMARIA

AGALAXIA POR PERIODO DE SECADO

SIGNOS: REPRESENTAN LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS A LA PRUEBA DE CMT



ND: FICHA NO DISPONIBLE

\* CMT NO REALIZADO DEBIDO A LA FLTA DE MUESTRA DURANTE EL PERIODO DE SECADO

Tabla 25: Comparación entre producción de leche- mamitis- presencia de anticuerpos en leche. Part: número de partos; L/D: litros/día.



	DATOS DE PRODUCCIÓN						MAMA IZQUIERDA					MAMA DERECHA				
	EDAD	RAZA	PART	D. LACT	LITRC	L/D	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1		manchega	5	341	298	0,87	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
2		manchega	ND	ND	ND	N	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
3		Cruce F1	3	154	80	0,51	+	*	*	*	*	-	*	*	*	*
4		manchega	2	103	118	1,14	-	-	-			-	+	+		
5		manchega	6	495	464	0,93	-	+	-	*	-	-	-	-	*	-
6		manchega	5	762	904	1,18	-	-	+	*	*	-	+	+/-	*	*
7		Cruce F1	4	630	630	1,00	-	+	-	*	*	-	+	-	*	*
8		Cruce F1	2	201	239	1,18	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
9		manchega	1	177	225	1,77	-				*	+				*
10		manchega	7	1035	1076	1,03	-	+	*	*	*	+	+	*	*	*
11		Cruce F1	2	68	53	0,77	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*
12		manchega	7	694	666	0,95	+	-	-	*	-	-	+	-	*	-
13		Cruce F1	3	538	748	1,39	-		-			-		-		
14		manchega	4	508	479	0,94	-	+	-	*	-	-	+	+	*	-
15		manchega	11	3420	3420	1,00	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
16		manchega	8	563	450	0,79	+	+	*	*	*	-	+	*	*	*
17		Cruce F1	5	480	480	1,00	-	-	*	*	*	-	-	*	*	*
18		manchega	4	177	160	0,90	-	-	*	*	-	-	-	*	*	-
19		manchega	2	160	185	1,15	-	-	-	*	*	-	-	+/-	*	*
20		manchega	9	706	592	0,83	-	-	*	*	*	-	+	*	*	*
21		manchega	3	159	135	0,84	-	*	*	*	-	-	*	*	*	-
22		manchega	3	190	193	1,01	+			-	-	+			-	-
23		manchega	3	268	284	1,05	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-
24		manchega	4	302	332	1,09	-	*	*	*	-	-	*	*	*	-
25		Cruce F1	2	215	275	1,27	-	-	-	*		-	-	-	*	
26		manchega	9	561	465	0,82	-	-		+	-	+	-		+	-
27		manchega	ND	ND	ND	ND	-	-	*			+	-	*		
28		manchega	6	835	704	0,84	+	-	*	*	*	+	-	*	*	*
29		manchega	2	236	237	1,0	+	-	-	*		-	-	-	*	
30		manchega	3	538	748	1,39	-	*	*	*	-	+	*	*	*	-
31		manchega	4	544	607	1,11	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
32		manchega	6	694	701	1,01	-	-	*	*	*	-	+	*	*	*
33		manchega	ND	ND	ND	ND						-				
34		manchega	3	336	270	0,80	-	-	-	*	*	-	-	-	*	*
35		manchega	4	60	60	1,00	+	*	*	*	*	-	*	*	*	*
36		manchega	3	324	382	1,17	-	-	-	*	*	+	-	-	*	*
37		manchega	4	199	160	0,80	+	-	*	*	+	+	-	*	*	-
38		manchega	ND	ND	ND	ND	-	-				+	-			
39		Cruce F1	2	189	233	1,23	-	-	-	*	-	+	-	-	*	-
40		manchega	9	1135	1493	1,31		-	-	*	*	-	-	-	*	*
41		manchega	5	374	422	1,12	+	+	-	*	-	+	-	-	*	-
42		manchega	4	411	396	0,96	+	-	-	*	-	+	-	-	*	-
43		manchega	7	710	626	0,88	-	-	*	*	-	-	-	*	*	+
44		manchega	4	310	274	0,88		*	*	*	*	+	*	*	*	*
45		manchega	7	783	957	1,22	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-
46		manchega	3	1705	1110	0,65		*	*	*	*	-	*	*	*	*
47		manchega	5	675	777	1,15	+	*	*	*	*	+	*	*	*	*
48		manchega	5	468	470	1,00	+	-	-	*	+	-	-	-	*	+
49		manchega	7	641	580	0,90	-	-	*	*	-	+	-	*	*	-
50		manchega	3	61	31	0,5	-	*	*	*	*	-	*	*	*	*







<u>COLORES: REPRESENTAN LOS RESULTADOS DEL CMT (CALIFORNIA MASTITIS TEST)</u>			
 CMT POSITIVO +++	 CMT POSITIVO ++	 CMT POSITIVO +	 CMT NEGATIVO
 CMT NO REALIZADO POR AUSENCIA DE MUESTRA DURANTE EL PERIODO DE SECADO			
 CMT NO REALIZADO POR AGALAXIA POR INDURACIÓN			
<u>SIGNOS: REPRESENTAN LOS RESULTADOS DE LA TÉCNICA VIROLÓGICA (PCR)</u>			
+ PCR POSITIVO			
- PCR NEGATIVO			
* NO REALIZADO POR AUSENCIA DE MUESTRA DURANTE EL PERIODO DE SECADO			
ND FICHA NO DISPONIBLE			

Tabla 26: Comparación entre producción-mamitis-presencia de virus en leche por PCR. Part: número de partos; D. Lact.: días de lactación; L/D: litros/día.

## 4.4. RESULTADOS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

### 4.4.1. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

Leroux *et al.* (1997) observaron que los lentivirus de pequeños rumiantes en Francia eran más similares a CAEV que a MVV en una región conservada del gen *pol*. Al realizar nuestro trabajo quisimos comprobar si el virus que afectaba a las ovejas de Guadalajara estaba más relacionado con MVV que con CAEV y decidimos secuenciar las porciones de ADN amplificadas de distintos animales, y compararlos, no sólo entre sí, sino también con la secuencia control.

Las muestras que elegimos para secuenciar en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) fueron las de la oveja nº 3 y nº 6 (sangre en la toma 5) que eran positivas por PCR, pero negativas por ELISA, y la muestra control.

Al buscar mediante BLAST las secuencias que producían un alineamiento significativo con la secuencia de nuestro control positivo pudimos confirmar que su homología era máxima con “Maedi-Visna-like virus EV-1” (GeneBank Accession No S51392) con un 95% de nucleótidos iguales, correspondiendo al origen del mismo (ver apartado 3.3.3).

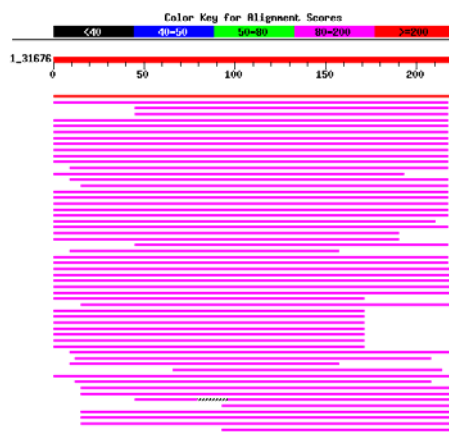


Figura 8: Secuencias que producen alineamientos significativos con la secuencia control.

Los resultados por análisis informático BLAST de las secuencias procedentes de sangre de la quinta toma de muestras de las ovejas nº 3 y nº 6 fueron de una homología máxima con MVV-like virus EV-1, con un 96% y un 97% de nucleótidos iguales en las secuencias analizadas respectivamente, seguido de unas homología menor con otros virus como virus Visna cepa Islandesa (GeneBank Accession No M60609) o virus Visna KV1772 (GeneBank Accession No S55323).

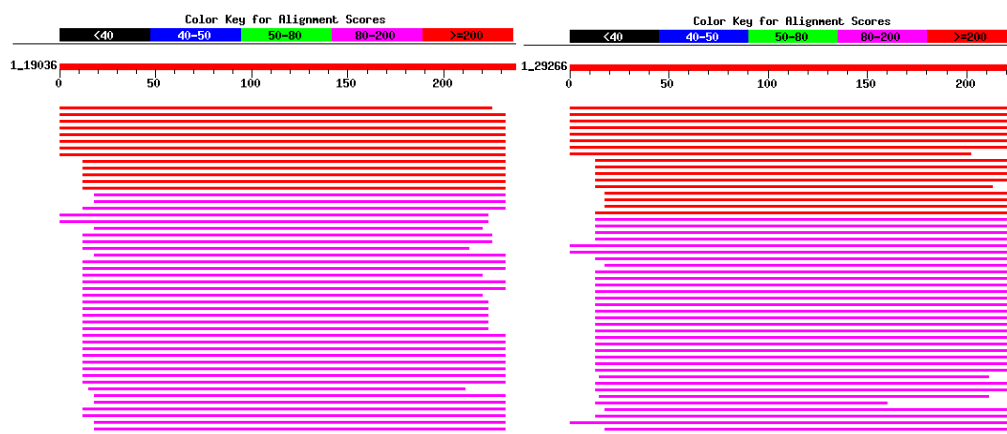


Figura 9: Secuencias que producen alineamientos significativos con las secuencias de la oveja nº 3 (izquierda) y la oveja nº 6 (derecha).

Al comparar las secuencias víricas de los animales nº 3 y nº 6 con la secuencia de MVV-like virus se observó que:

- a) La secuencia de MVV-like EV1 sólo difería en un nucleótido con las secuencias de las muestras, siendo la sustitución de guanina por timina.

- b) La secuencia procedente de la muestra de sangre de la oveja nº 3 había sufrido dos mutaciones con respecto a la muestra nº 6 y a la control. En ellas se habían sustituido dos timinas por una citosina y una adenina, respectivamente.

```

gtaaattgat  acactgaggg  actcaatttc  catccttgt  ggcaacacttt
gtaaattgnt  ncnetgaggg  actcaatttc  catccttgt  ggcaacacttt
gtaaattgnn  nactgaggg  actcaatttc  catccttgt  ggcaacacttt

ccaataatac  cttacacaag  gtcccaaatt  attgggactc  agcatggtaa
ccaataatac  cttacacaag  gtcccaaatt  attgggactc  agcatggtaa
ccaataatac  cttacacaag  gtcccaaatt  attgggactc  ancatggtaa

aacatgtata  cgggtctataa  gggttcataa  atgggtattgt  aaaatatgca
aacatgtata  ctgtctataa  gggttcataa  aagggtattgt  aaaatatgca
aacatgtata  ctgtctataa  ggntcatata  atgggtattgt  aaaanatgca

tctcctatat  ccaatactgt  tacatgtttc  tttttctgca  atcctcccgg
tctcctatat  ccaatactgt  tacatgtttc  tttttctgca  atcctcccgg
tctcctatat  ccaatactgt  tacatgtttc  tttttctgca  atcctcccgg

atgtggtaat  cccaactgtg  cctct
atgtggtaat  cccaactgtg  cctctg
atgtggnaat  cccaactgtg  cctctg

```

Figura 10: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación. Cada secuencia viene determinada por un color, correspondiéndose la de color negro con la secuencia de MVV-like virus EV1 (GeneBank Accession No S51392), la de color rojo con la muestra de sangre de la quinta toma de muestras de la oveja nº 3, y la de color verde con la muestra de sangre obtenida de la quinta toma de muestras de la oveja nº 6.

#### 4.4.2. SECUENCIAS AMINOACÍDICAS

Cada secuencia nucleotídica da lugar a tres posibles secuencias aminoacídicas o “marcos” (“frames” en inglés), de las que sólo una producirá la proteína vírica. Hemos

agrupado los “frames” correspondientes de cada muestra en tres grupos que se observan en la figura.

- En el grupo 1 se observa que la sustitución del nucleótido guanina por el de timina, que presentaban las ovejas nº 3 y nº 6, produce un cambio de aminoácido. Así en la secuencia de MVV-like EV1 se encuentra el aminoácido glicina mientras que en las secuencias mutadas hay cisteína. Además la mutación de timina por adenina que presenta la oveja nº 3 produce el aminoácido arginina en lugar de asparragina.
- En el grupo 2 no existe cambio de aminoácido por la mutación de guanina por timina, mientras que sí se observa el resultado de las dos mutaciones presentes en la oveja nº 3. De este modo la oveja con la secuencia mutada presenta una tirosina seguida de lisina en lugar de isoleucina y metionina.
- En el grupo 3 son detectables todas las mutaciones. Existe un cambio de arginina presente en la secuencia de MVV-like EV1 por leucina en las secuencias de las dos ovejas.

#### Grupo 1

```
VN*YTEGLNFHPCGNTFQ*YLTQGPKLLGLSMVKHVYGL*GSYNGIVKYASPISNTVTCTFFFCNPPGCGNPNCAS
VNXXEGLNFHPCGNTFQ*YLTQGPKLLGLSMVKHVYCL*GSYKGIVKYASPISNTVTCTFFFCNPPGCGNPNCAS
VNXXTEGLNFHPCGNTFQ*YLTQGPKLLGLXMKHVYCL*GSYNGIVKXASPISNTVTCTFFFCNPPGCGNPNCAS
```

#### Grupo 2

```
*IDTLRDSISILVATLSNNTLHKVPNYWDSAW*NMYTVYKVHIMVL*NMHLLYPILLHVSFSAILPDVVIPTVP
*IXXLRDSISILVATLSNNTLHKVPNYWDSAW*NMYTVYKVHTKVL*NMHLLYPILLHVSFSAILPDVVIPTVP
*IXXLRDSISILVATLSNNTLHKVPNYWDSXW*NMYTVYKXHIMVL*XMHLLYPILLHVSFSAILPDVXIPTVP
```

#### Grupo 3

```
KLIH*GTQFPSLWQHFPPIPYTRSQIIGTQHGTCTIRSI*WYCKICISYIQCYMFLFLQSSRMW*SQLCL
KLXX*GTQFPSLWQHFPPIPYTRSQIIGTQHGTCTILSIRFIQRYCKICISYIQCYMFLFLQSSRMW*SQLCL
KLXH*GTQFPSLWQHFPPIPYTRSQIIGTXHGKTCTILSIRXI*WYCKXCISYIQCYMFLFLQSSRMWXSQCL
```

Figura 11: Alineamiento de las posibles secuencias aminoacídicas derivadas de las secuenciaciones nucleotídicas.

## **5. CONCLUSIONES**

1. El diagnóstico de la infección por MVV es difícil, pues la concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR se considera débil. Esto puede deberse a: a) que los animales tardan mucho tiempo, incluso años en seroconvertir; b) que la técnica ELISA empleada no detecte IgAs en la leche; o c) en el caso de la PCR, al pequeño porcentaje de células infectadas, al secuestro de las células infectadas en distintas localizaciones orgánicas, o a que los cebadores utilizados no sean los más adecuados para la amplificación del virus. La discrepancia de los resultados obtenidos hace que recomendemos la utilización de al menos dos técnicas de forma conjunta para el diagnóstico.
2. La prevalencia de la infección por MVV aumenta a lo largo del estudio, por lo que podemos considerar que la transmisión del virus se produce de una manera rápida y eficaz. De igual forma, con el transcurso del tiempo, el virus parece diseminarse fácilmente por el organismo animal, no quedando recluido constantemente a un único compartimiento.
3. La detección de ADN proviral mediante PCR no es constante en un animal dado a lo largo del tiempo. Esto induce a pensar que el virus sufre mutaciones tras ser detectado inicialmente por el sistema inmune, pudiendo volver a escapar de él.
4. La respuesta inmune de base humoral parece ser bastante ineficiente, puesto que se detecta ADN proviral tanto en animales que nunca seroconvirtieron, como en otros que sí presentan anticuerpos frente a MVV. Esto podría deberse a que el virus puede tener mecanismos eficaces de evasión de la respuesta inmune y escaso poder inmunogénico.

5. A lo largo de nuestro estudio se observa la posible relación entre la mastitis subclínica y la infección por MVV en animales PCR positivos pero ELISA negativos. Este hecho reforzaría la teoría de que se produce una respuesta celular tan fuerte y temprana que posiblemente destruiría las células infectadas con MVV presentes en la glándula mamaria. De este modo aumentarían el número de células en leche, favoreciendo la detección de la mastitis subclínica por el test de mastitis de California.
6. Las secuencias víricas analizadas parecen sugerir que el virus presente en la explotación estudiada está íntimamente emparentado con otros aislados de MVV, y no de CAEV.



## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Andrésdóttir V., 2003. Evidence of recombination in the envelope gene of maedi-visna virus. *Virus Genes* 27: 5-9.
- Artigas C, Vendrell J, Mejías, JM, 1999. Estudio seroepidemiológico frente a chlamydiosis, visna maedi y toxoplasmosis en 64 rebaños de la sierra norte de Sevilla. XXIV Jornadas Científicas de SEOC. Soria pp: 287-290.
- Barlough J, East N, Rowe JD, Van Hoosear K, DeRock E, Bigornia L, Rimstad E, 1994. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods* 50: 101-113.
- Begara I, Luján L, Hopkins, J, Collie DD, Miller HR, watt NJ, 1995. A study on lymphocyte activation in maedi-visna virus induced pneumonia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45: 197-210.
- Bertoni *et al.*, 1994. Antibody reactivity to the immunodant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp 38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *J. Virol.* 68: 7139-47
- Blacklaws BA, Berriatua E, Torsteindóttir S, Watt NJ, de Andrés D, Klein D, Harkiss GD, 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 101: 199-208
- Blacklaws B, Bird P, McConell I, 1995. Early events in infection of lymphoid tissue by a lentivirus, maedi-visna. *Trends Microbiol.* 3: 434-440.
- Bolea R., 1998. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza
- Brahic M y Haase AT, 1981. *Lentivirinae: Maedi/Visna virus group infections.* Comparative diagnosis of viral diseases. Academic Press.
- Braun MJ, Clements JE, Gonda MA, 1987. The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the env gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *J. Virol.* 61: 4046-4054.
- Brodie SJ, Pearson LD, Zink MC, 1995. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication but not entry is restricted to macrophages of specific tissues. *Am. J. Pathol.* 146: 250-263.
- Brodie SJ, Pearson LD, Snowden GD, DeMartini JC, 1993. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus infected sheep. *Arch. Virol.* 130:413-428.

- Brodie SJ, Marcom KA, Pearson LD, Anderson BC de la Concha Bermejillo A, Ellis JA, DeMartini JC, 1992. Effects of virus load in the patogénesis of lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. *J. Infect. Dis.* 166: 531-541.
- Carey N, Dalziel RG, 1993. The biology of maedi visna virus, an overview. *Brit. Vet. J.* 149: 437-454.
- Carroza ML, Mazzei M, Bandechi, Arispici M, Tolari F, 2003. In situ PCR associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the maedi visna virus genome in tissue secretions of sheep infected naturally. *J. Virol Meth.* 107: 121-127.
- Celer V Jr, Celer V, Nejedlák, Bertoni G, Peterhans E, Zanoni G, 2000. The detection of proviral DNA by seminested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech maedi – visna isolates based on gag gene sequences. *J. Vet. Med.* 47:203-215.
- Chebloune Y, Karr B, Sheffer D, Leung K, Narayan O, 1996. Variation sin lentiviral gene expresión in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.* 77: 2037-2051.
- Clements JE, Zink MC, 1996. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 100-117.
- Coffin Jm., 1996. Retrovirus restriction revealed. *Nature* 382: 762-767.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T, 1999. Robbins' Pathologic basis of disease. Ed W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 84 y 649-650.
- Craig L, Nealen ML, Strandberg JD, Zink C, 1997. Differential replication of ovine lentivirus in endothelial cells cultured from different tissues. *J. Virol* 238: 316-326.
- De la Concha Bermejillo A., 1997. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice.* 13.
- De la Concha Bermejillo A, Brodie SJ, Magnus-Corral S, Bowen RA, DeMartini JC, 1995. Pathologic and serologic responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *JAIDS and Human Retrovirol.* 8: 116-123.
- De La Cruz M., Serrano E., Montoro V., Marco J., Romeo M., Baselga R., Albizu I., Amorena B., 1994. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in Manchega sheep at mid-late lactation. *Small Ruminant Research* 14, 175-180.

- Cutlip RC, Jackson TA, Laird GA, 1977. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 38: 1081-1084.
- Garrity RR, Rimmelzwaan G, Minassian A, Tsai WP, Lin G, de Jong JJ, Goudsmit J, Nara PL, 1997. Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *J. Immunol.* 159: 279-289.
- Gendelman HE, Narayan O, Molineaux S, Clements JE, Ghotbi Z, 1985. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7086-7090.
- Gorrel MD, Brandon MR, Sheffer D, Adams RJ, Narayan O, 1992. Ovine lentivirus is macrophage-tropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *J Virol* 66: 2679-2688.
- Gudnadottir M., 1974. Virus visna in sheep. *Prog. Med. Virol.* 18: 336-349.
- Harkiss G.D., Green C., Anderson A, *et al.*, 1995. Immunoglobulin deposits in synovial membrane and cartilage and phenotype analysis of chondrocyte antigens in sheep infected with visna retrovirus. *Rheumatol. Int.* 15: 15-22.
- Harkiss GD, Watt NJ, King TJ, Williams J, Hopkins J, 1991. Retroviral arthritis: phenotypic analysis of cells in the synovial fluid of sheep with inflammatory synovitis associated with visna virus infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 60: 106-117.
- Howers DJ, Nauta IM, 1989. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infection. *Vet. Microbiol.* 19: 127-139.
- Howers DJ, Gielkens ALJ, Schaake J, 1982. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi visna virus. *Vet. Microbiol.* 7: 209-219.
- Juste RA, Kwang J, De la Concha –Bermejillo A., 1995. Dynamics of cell associated viremia and antibody response during the early phase of lentivirus infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 59: 563-8
- Karr J, 1996. Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine-arthritis-encephalitis virus. *Virology.* 225:1-10.
- Kennedy PG, Narayan O, Ghotbi Z, Hopkins J, Gendelman HE, Clements JE, 1985. Persistent expression of Ia antigen and viral genome in visna-maedi virus-induced
-

- inflammatory cells. Possible role of lentivirus-induced interferon. *J Exp. Med.* 162: 1970-1982.
- Kennedy S, Narayan O, 1986. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis encephalitis virus. *J. Comp. Pathol.* 95: 609.
- Kuzmak J., Kedziora A., Rola M., Kozaczynska B., Chebloune Y., Galloway K., 2003. Evaluation of PCR and PCR/hybridization method for the detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47: 293-300.
- Kwang J, Keen J, Cutlip RC, Littledike ET, 1993. Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 189-193.
- Lairmore MD, Akita GY, Russell HI, DeMartini JC, 1987. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with *in vivo* pathogenicity. *J. Virol.* 61: 4038-4042.
- Legastelois I, Cordie G, Cozon G, Cadore JL, Guiguen F, Greenland T, Mornex JF, 1996. Visna maedi virus induced expression of interleukin 8 in sheep alveolar cells following experimental *in vitro* and *in vivo* infection. *Res Virol.* 147: 191-197.
- León L, Prats J. 1996 . Encuesta serológica de la infección por el virus de maedi-visna la población ovina de Moratalla (Murcia). XX Jornadas SEOE. Logroño pp, 119-127.
- Lerondelle C, Greenland T, Jane M, Mornex JF, 1995. Infection of lactating goats by mammary installation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Dairy Sci.* 78: 850-855.
- Leroux C, Chastang J, Greenland T, Mornex JF, 1997. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.* 142: 1125-1137.
- Leroux C, Lerondelle C, Chastang J, Mornex JF, 1997. Rt-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet. Res.* 28: 115-221.
- Luján L, Bergara I, Collie DDS, Watt NJ, 1995. CD8+ lymphocytes in bronchoalveolar lavage and blood. *In vivo* indicators of lung pathology caused by maedi visna virus. *Vet. Immunol. Immunopathol* 49 : 89-100.

- Luján L, Badiola JJ, García Marín JF, Moreno B, Vargas MA, Fernández De Luco D, Pérez V, 1993. Seroprevalence of maedi-visna infection in sheep in north-east of Spain. *Prev. Vet. Med* 15: 181-190.
- Luján L., Gómez N., Bolea R., García-Marín JF, Varea R., Vargas A., Badiola J. J., 2001. *Ovis* N° 72.
- Maqueda A, Olivares T, 1993. Clasificación de las causas de muerte ovino adulto en Tierra de campos. La necesidad de programa sanitario. SEOC Albacete
- MorinT, Grézel D,Bouzar B, Villet S, Greenland T,Guiguen F, Fornazero C, Mornex JF, Chebloune Y, 2003. Experimental model of lentivirus reactivation for virological and immunological studies in caprine-arthritis-encephalitis virus infected goats. *Bull.Vet, Inst. Pulawy* 47: 275-286.
- Narayan, O, Wolinsky JS, Clements JE, Strandberg JD, Griffin DE, Cork LC, 1982. Slow virus replication : the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *J. Gen. Virol.* 259: 345-356.
- Narayan O, Cork LC, 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev. Infect. Dis.* 7: 89-98.
- Narayan O, Zink Mc, Gorrell M, *et al.*, 1992. Lentivirus induced arthritis in animals. *J. Rheumatol. Suppl.* 32: 25-32.
- Narayan O, Zink M, Gorrell MC, Crane S, Huso D, Jolly P, Saltarielli M, Adams RJ, Clements JE, 1993. The lentiviruses of sheep and goats. *The Retroviridae* 2: 229-255.
- Ouzrout R, Lerondelle C, 1990. Expression of visna-maedi in the mammary secretions of a seropositive ewe during gestation and then an artificial induction of lactation. *Ann Réch. Vét* 21: 69-73
- Pancino G, Ellerbrok H, Sitbon M, Sonigo P, 1994. Conserved framework of envelope glycoproteins among lentiviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 188: 77-105.
- Pepin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, 1998. Maedi visna virus infection in sheep : a review. *Vet. Res.* 29 : 341-367.
- Petursson G, Palsson PA, Georgsson G, 1989. Maedi-visna in sheep : host-virus interactions and utilization as a model. *Intrvirology. Suppl.* 1 : 36-44.
- Prats J, León L. 1994. Encuesta inmunológica de maedi en la población ovina de Caravaca (Murcia). XIX Jornadas científicas de SEOC. Burgos pp, 353-56.

- Reviriego Fj. 1998. Seroprevalencia de maedi-visna y artritis encefalitis caprina. Estudio realizado en la provincia de Ávila. *Albéitar* 21: 15.
- Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, DeRock E, Pedersen NC, 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis encephalitis virus infection in goats. *Am. Vet. Res.* 54 : 1858-1862.
- Rolland M, Mooney J, Valas S, Perrin G, Mamoun RZ, 2002. Characterization of an Irish caprine lentivirus strain SRLV: phylogeny revisited. *Virus. Res.* 85: 29-39.
- Ruff G, Joosten I, Howald M, Davis WC, Lazary S, 1993. Serological and biochemical detection of B-cell antigens in goats. *Eur. J. Immunogenet.* 20: 23-284.
- Russo P, Vitu C, Vigne R, Filippi P, Giauffret A, 1988. Recherches expérimentales sur le maedi visna. *Comp.. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 35-41.
- Ruz JM, Ramo A, Abril F, Tremul C, Lara S, López C, Picazo R, 2000. Estudio serológico del visna-maedi en catorce explotaciones indemnes de brucelosis pertenecientes a ganaderías de la cooperativa Cotega. XXV jornada SEOC. Teruel pp, 401-405
- Shah C, Huder JB, Boni J, Schonmam M, Muhler J, Lutz H, Schupbach J, 2004. Direct evidence for natural transmission of small ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and viceversa. *J. Virol. Meth.* 118: 123-130.
- Sotelo JM, Gutiérrez A, Fernández M, Cármenes P, Muñoz M 1995. Seroprevalencia de la infección por lentivirus en ganado ovino y caprino de la provincia de León. IV Congreso Nacional de Virología.
- Torsteinsdóttir S, 2003. Intratracheal inoculation as an efficient route of experimental infection with maedi visna virus. *Res. Vet. Sci.* 75: 245-247.
- Torsteindottir S, Georsson G, Gisladdottir E, 1992. Pathogenesis of central nervous system lesions in visna cell-mediated immunity and lymphocyte subsets in blood, brain and cerebrospinal fluid. *J. Neuroimmunol.* 41 : 149-158.
- Terpstra C, DeBoer GF, 1973. Precipitating antibodies against maedi visna virus in experimentally infected sheep. *Arch. Ges. Virusforsch.* 43 : 53-62.
- Van der Molen, 1985. A chronic indurative mastitis in sheep, associated with maedi/visna virus infection. *Vet. Q.* 7 : 112-119.
- Vega GS, Asensio A, Agundo R, De La Fuente R.1995. A serological survey of MVV in Comunidad de Madrid. *Immunobiology of Viral Infections* 371-373.
- Vitu C, Russo P, Filippi P, Vigne R, Querat G, Giauffret A, 1982. Une technique ELISA pour détection des anticorps anti-virus maedi visna. Etude comparative

- avec l'immunodiffusion en gélose et la fixation du complément. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5: 469-481.
- Winward L, Leenderstsen L, Shen DT, 1979. Microimmunodiffusion test for diagnosis of ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 40: 564-566.
- Zanoni RG, Nauta IM, Pauli U, Peterhans E, 1991. Expression in *Escherichia coli* and sequencing of the coding region for the capsid protein of Dutch maedi visna virus strain ZZV 1050: application of recombinant protein on enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of caprine arthritis encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1290-1294.
- Zanoni RG, Nauta IM, Pauli U, Peterhans E, 1990. Detection of caprine arthritis encephalitis and maedi visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia* 46: 316-318.
- Zhang Z, Guo J, Ermel RW, Bazer FB, Giavedoni L, de la Concha Bermejillo A, 2000. Construction and characterization of a recombinant ovine lentivirus carrying the optimised green fluorescent protein gene at the dUTPase locus. *Ann. Meet Am. Soc. Virol.* 19 : 144.
- Zink MC, Johnson LK, 1994. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus. Res.* 32 : 139-154.